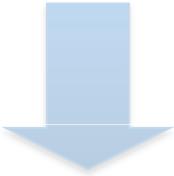
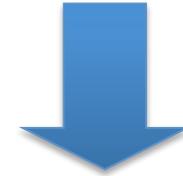
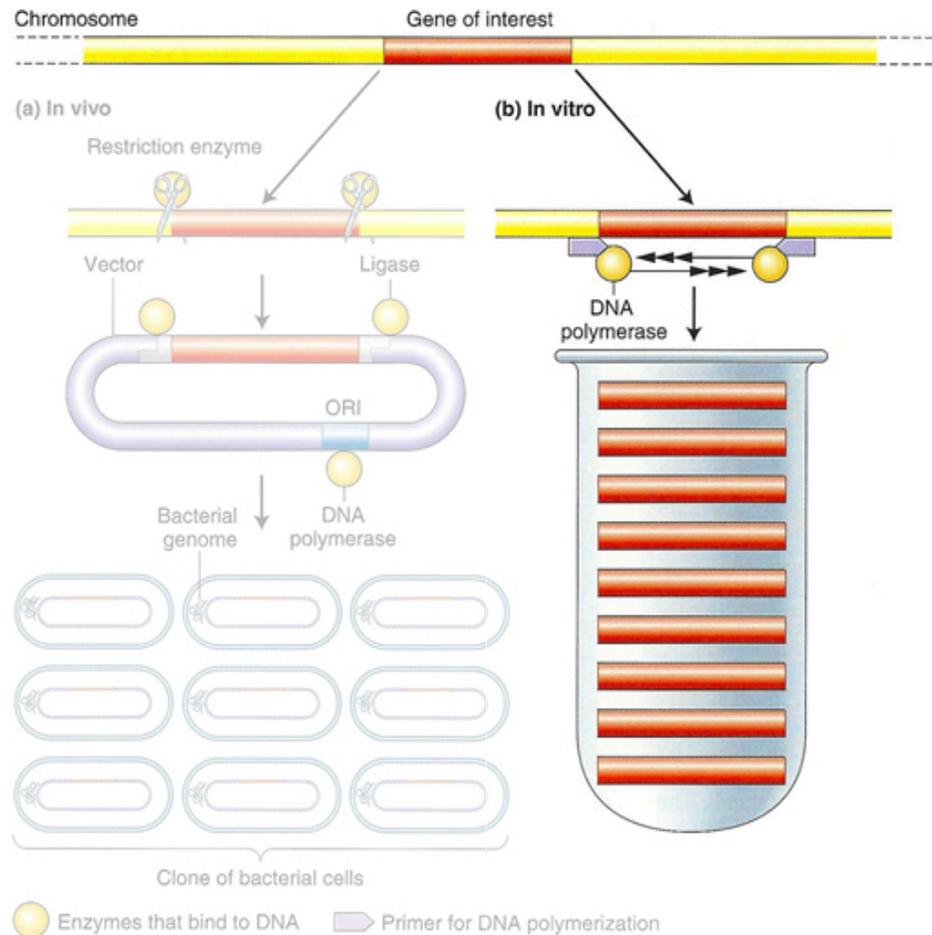


Clonazione di un frammento di DNA



Sistema cellulare

Cloning vs. PCR



Direttamente in vitro (PCR)

PCR: Polymerase Chain Reaction

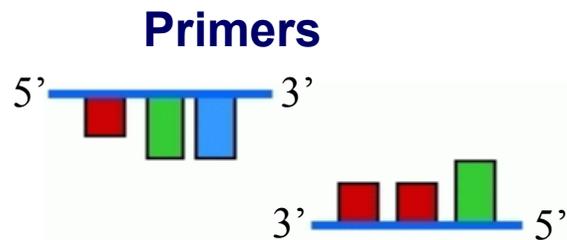
Ideata da K. Mullis nel 1985

"Beginning with a single molecule of the genetic material DNA, the PCR can generate 100 billion similar molecules in an afternoon. The reaction is easy to execute. It requires no more than a test tube, a few simple reagents, and a source of heat." (Mullis, 1990)

Nobel per la chimica nel 1993



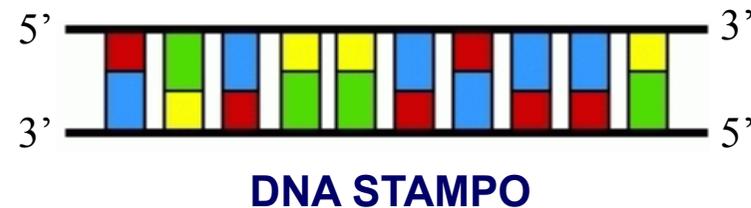
Elementi necessari in una reazione di amplificazione



Desossi Nucleotidi trifosfati (dNTP)

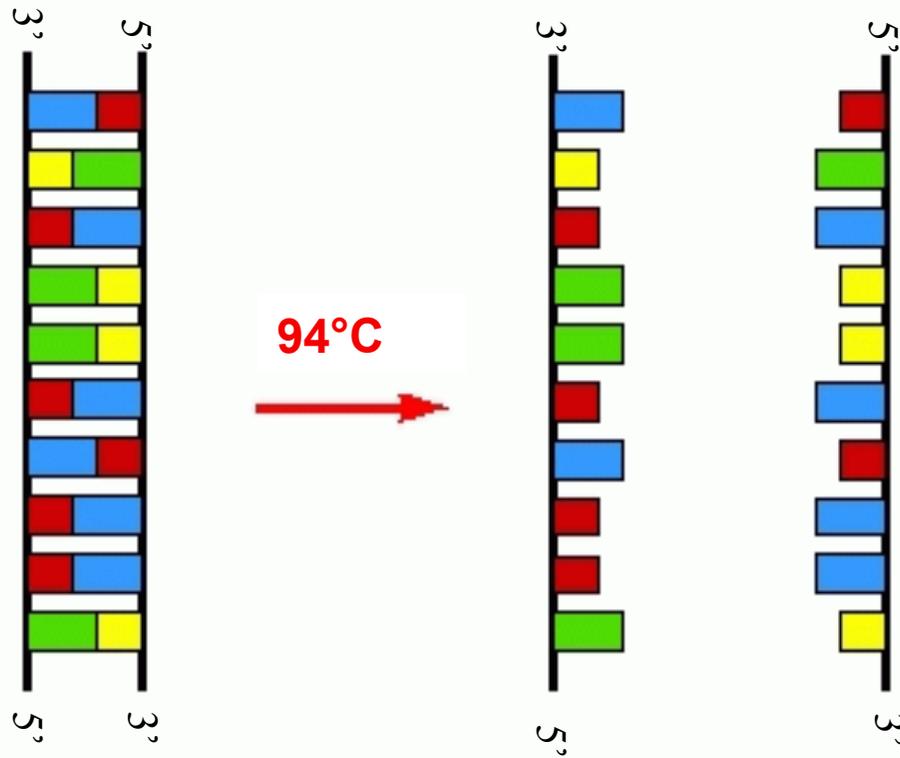


DNA polimerasi



fase 1: DENATURAZIONE

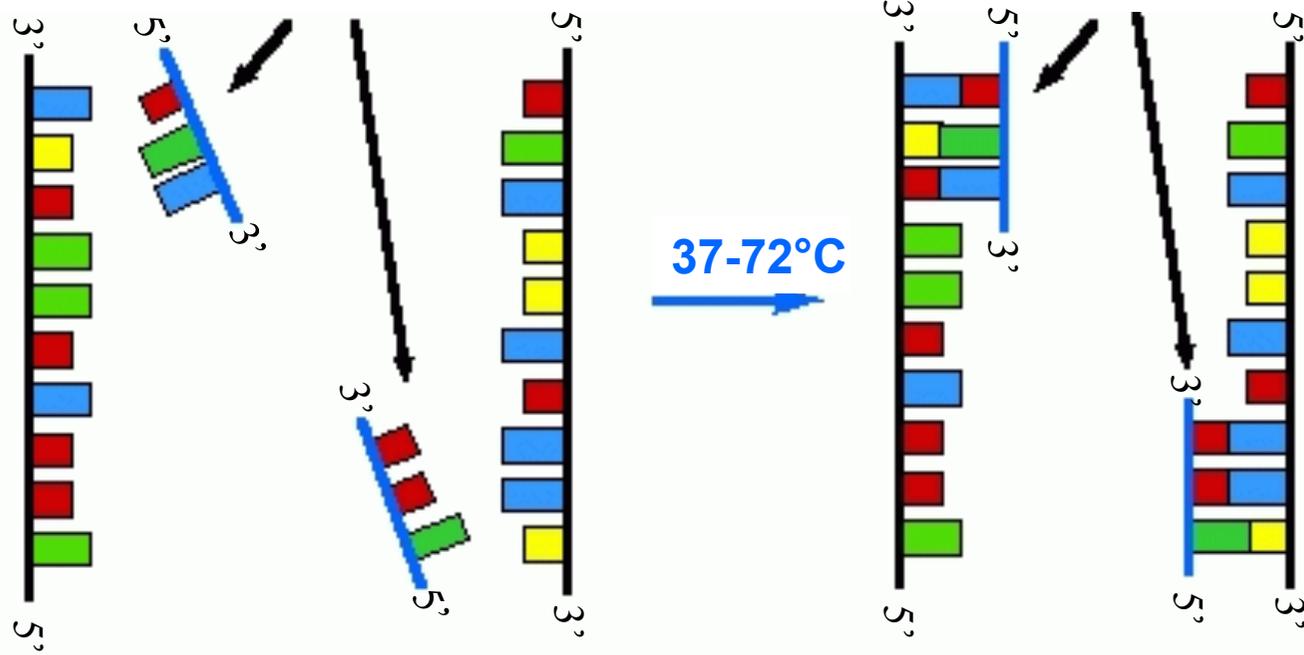
La doppia elica di DNA stampo è aperta al calore



fase 2:

ANNEALING

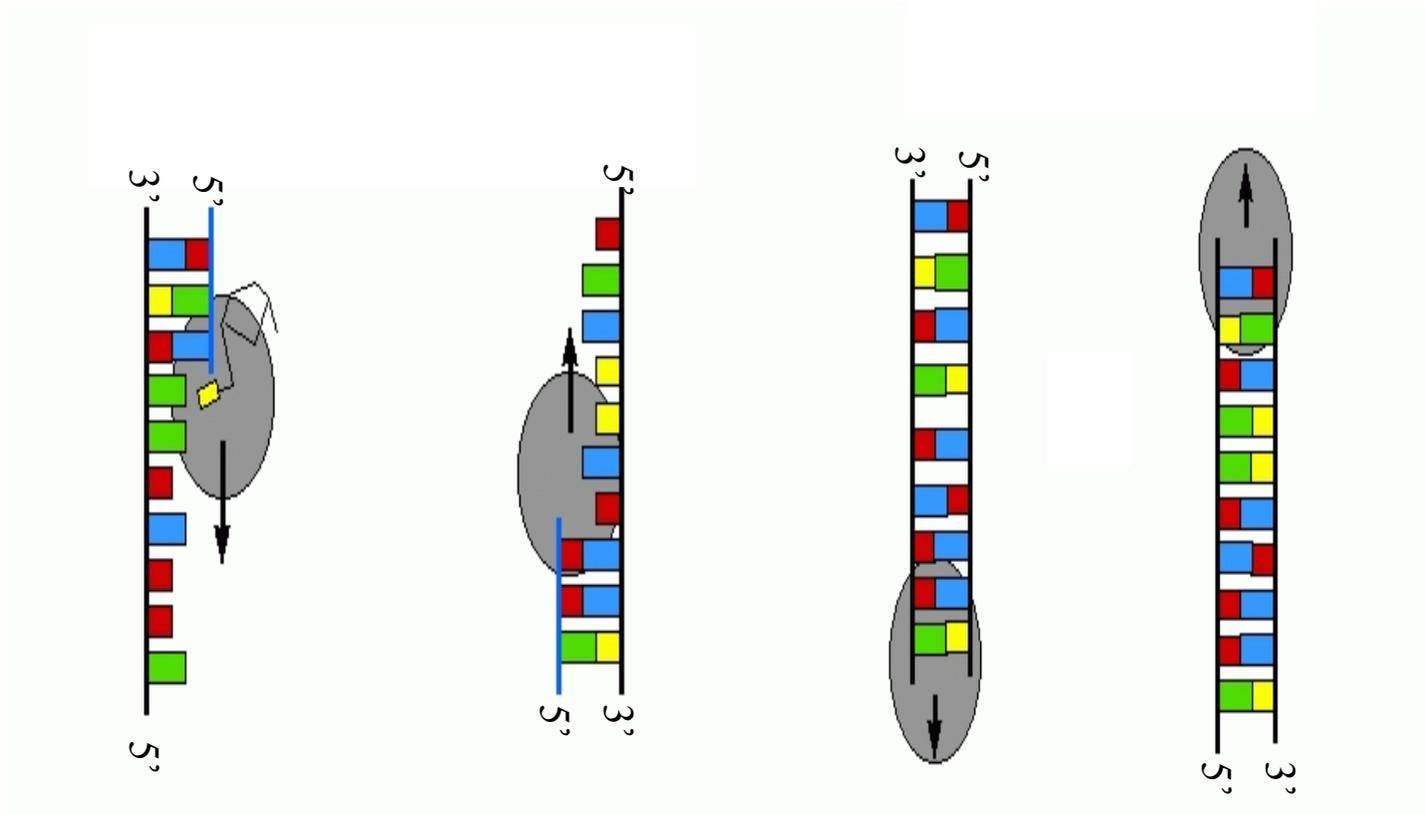
I primers si appaiano alle sequenze complementari sul DNA stampo



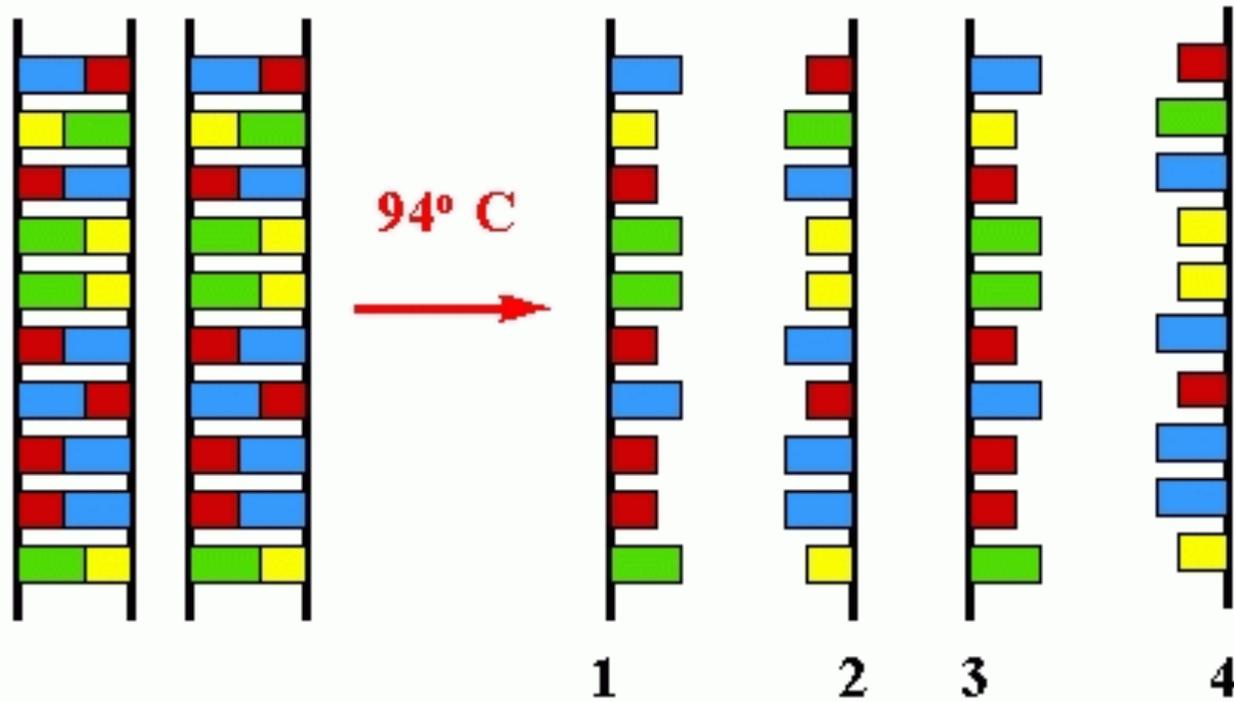
fase 3:

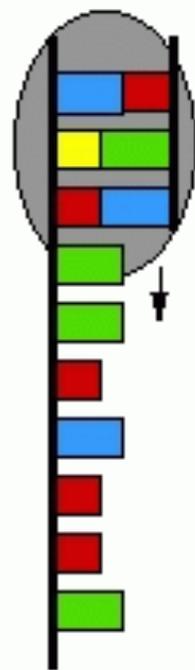
ESTENSIONE

La DNA polimerasi allunga gli inneschi e produce 2 nuove catene di DNA

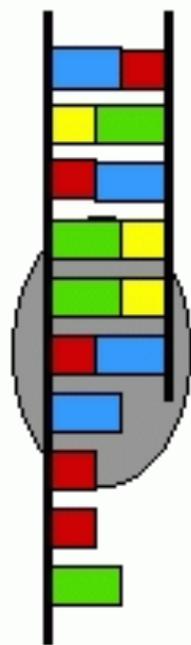


IL PROCESSO SI RIPETE

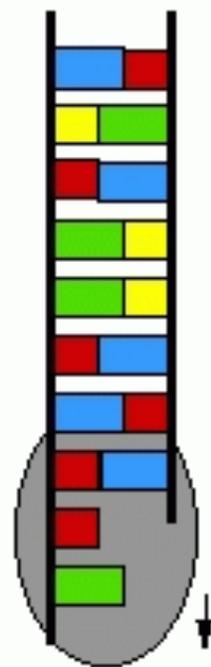




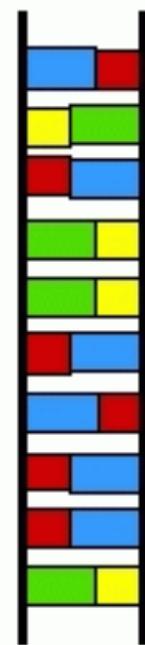
1



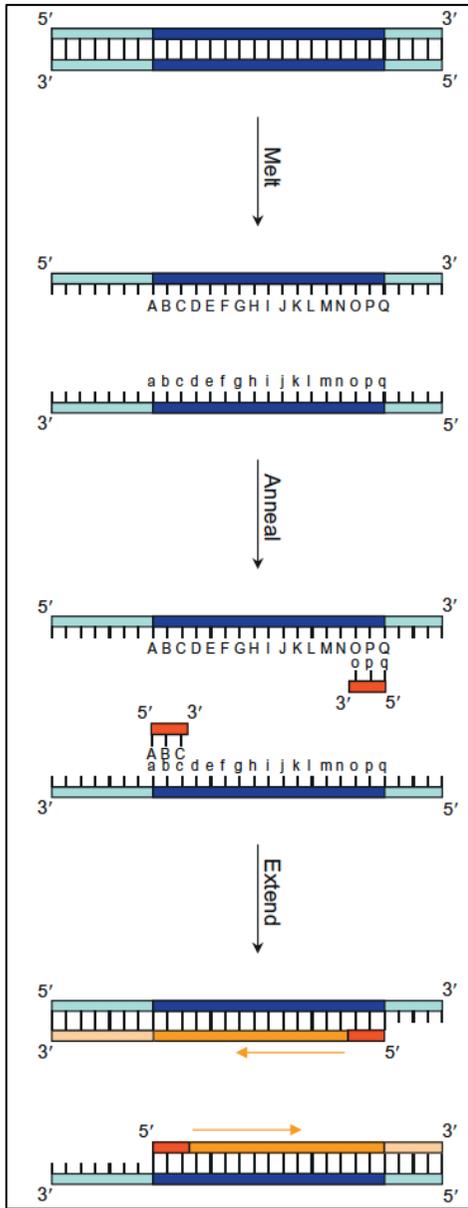
2



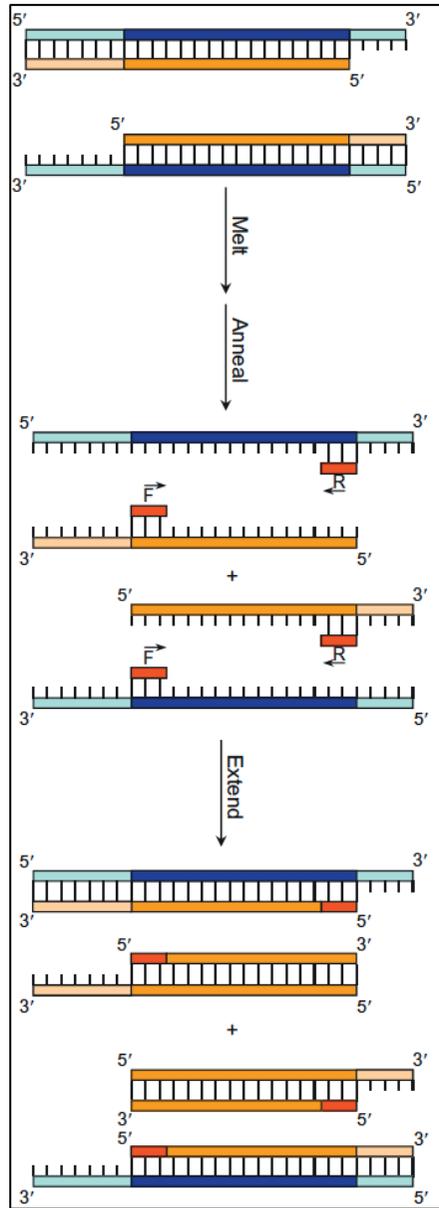
3



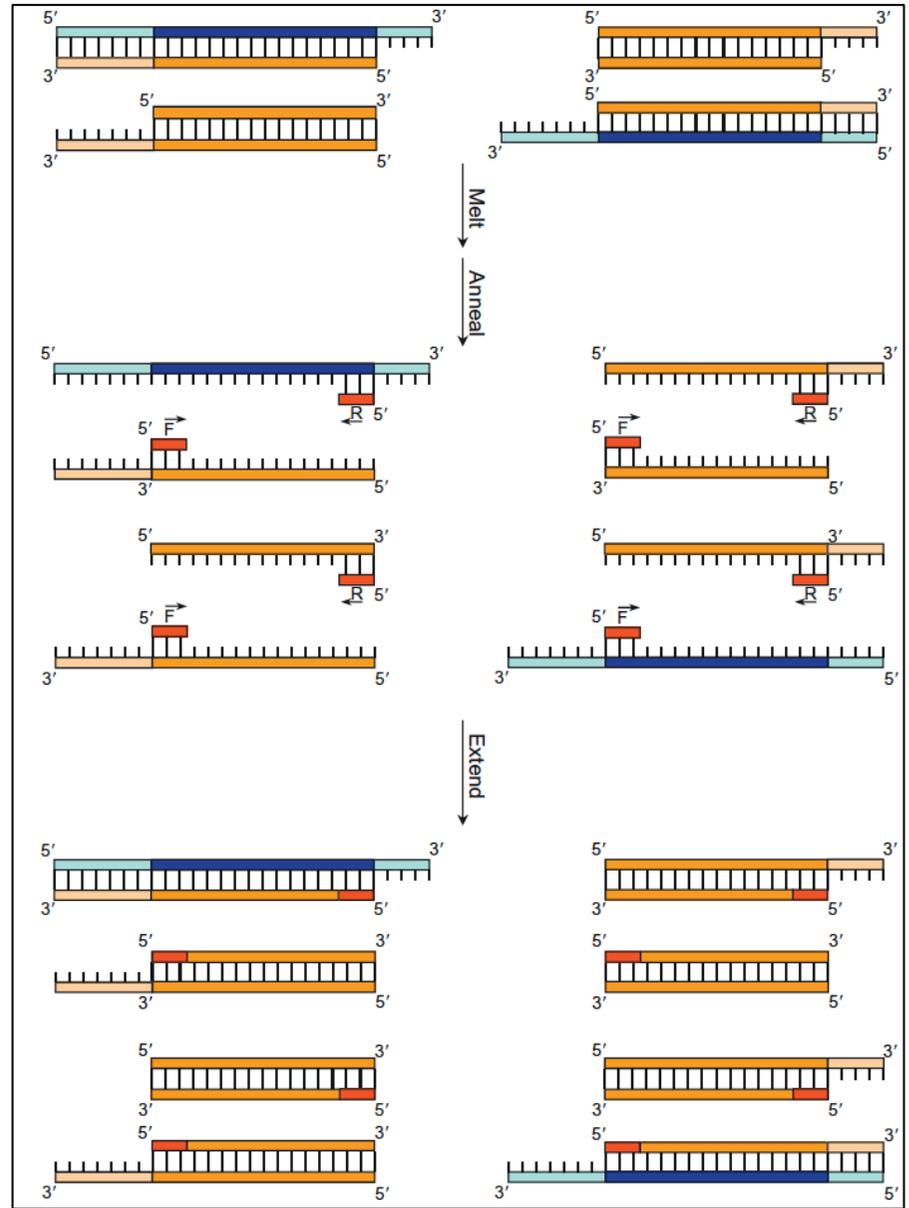
4



1° ciclo



2° ciclo



3° ciclo

Species

Number of copies



Disappears after first round



Remains constant at 1



Remains constant at 1



Equal to $(n-1)$



Equal to $(n-1)$



Equal to $[2^n - (2n)]$

Ad ogni ciclo il numero di molecole di DNA “copiato” teoricamente raddoppia

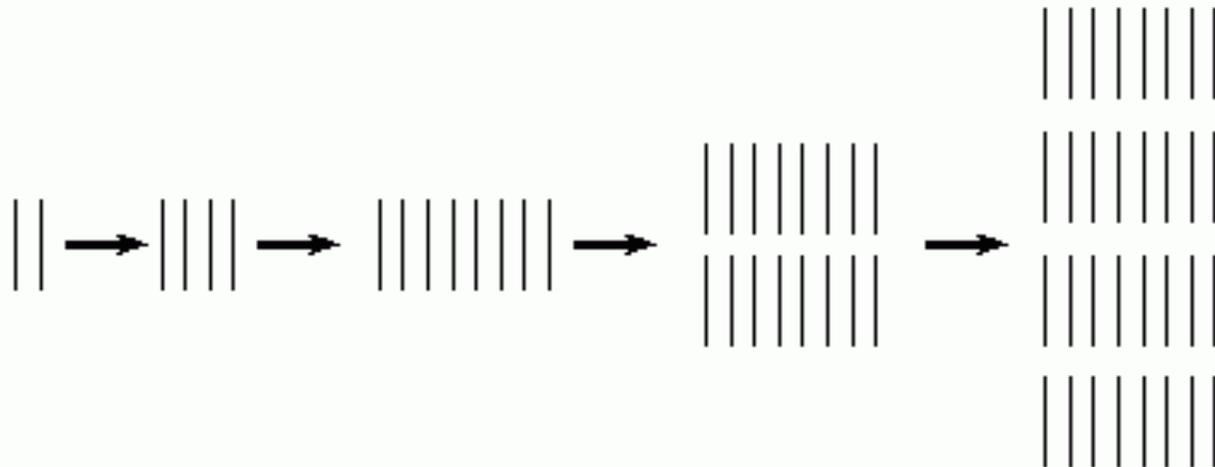
1

2

3

4

5



Resa teorica di una reazione di PCR a partire da una singola copia di DNA

Numero di cicli

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

Numero di molecole di amplificati

2
4
8
16
32
64
128
256
512
1.024
2.048
4.096
8.192
16.384
32.768
65.536
131.072
262.144
524.288
1.048.576
2.097.152
4.194.304
8.388.608
16.777.216
33.554.432
67.108.864
134.217.728
268.435.456
536.870.912
1.073.741.724

$$Y = N2^n$$

Y= numero molecole di DNA
amplificato

N= numero molecole di DNA
di partenza

n= numero dei cicli di PCR

Fasi della PCR

1) SCREENING PHASE:

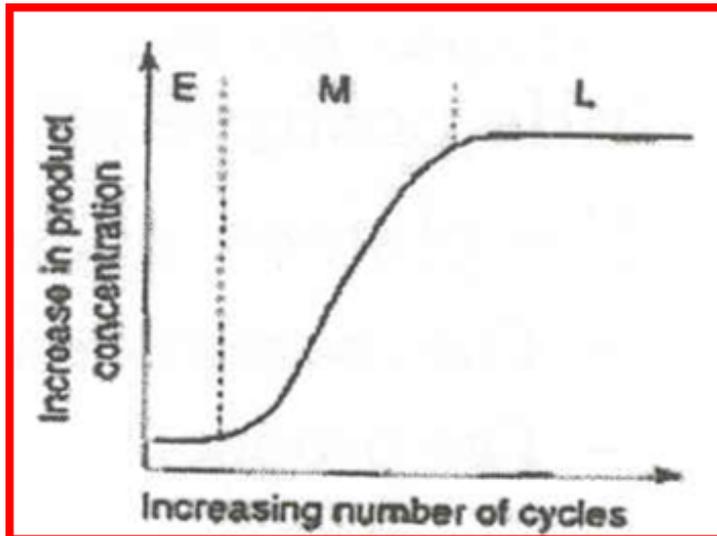
COMPRENDE I PRIMI CICLI
IL FRAMMENTO DI DNA DA AMPLIFICARE E'
SELEZIONATO DAL LEGAME SPECIFICO DEI PRIMERS

2) AMPLIFICATION PHASE:

IL NUMERO DI COPIE DEL FRAMMENTO DI DNA
AUMENTA ESPONENZIALMENTE

3) PLATEAU PHASE

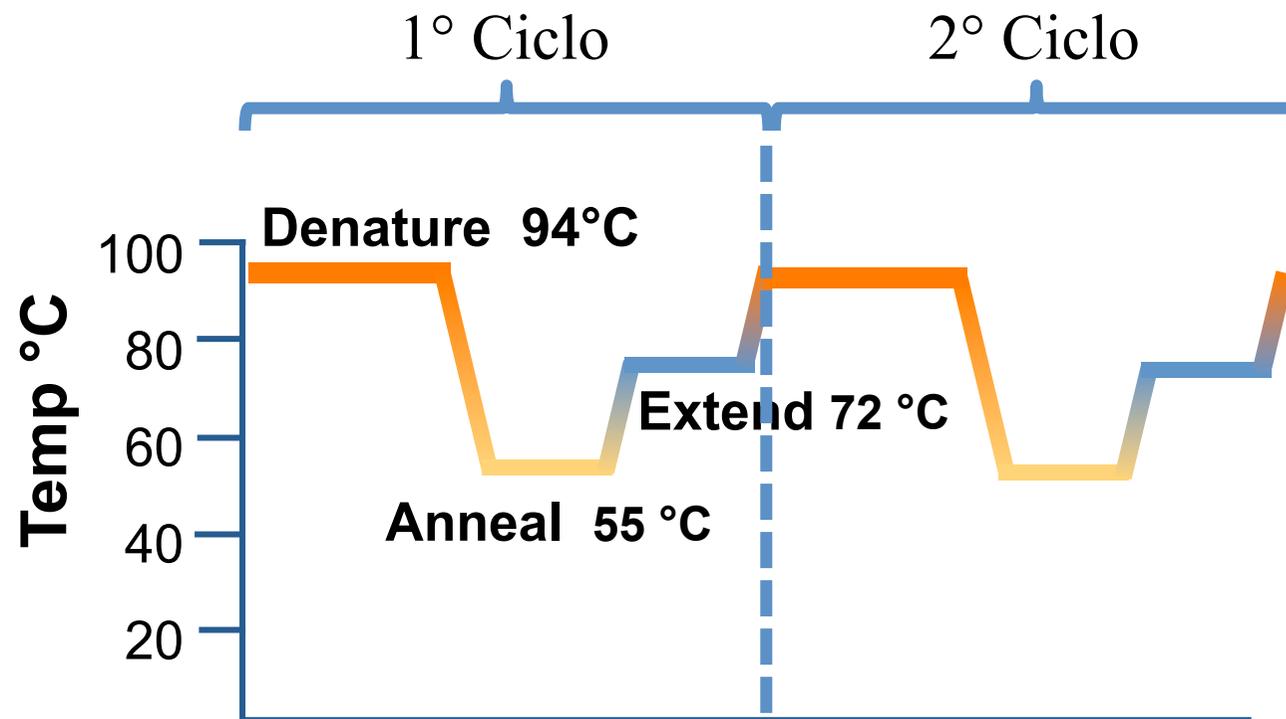
IL PRODOTTO DI REAZIONE SI ACCUMULA, TUTTO
L'ENZIMA PRESENTE E' OCCUPATO E IL RAPPORTO PRIMER:
DNA STAMPO DIMINUISCE FAVORENDO IL SELF-
ANNEALING DEI FILAMENTI. LA REAZIONE INIZIA A
SATURARSI E CESSA DI ESSERE ESPONENZIALE.



Termociclatori



Profilo di Amplificazione



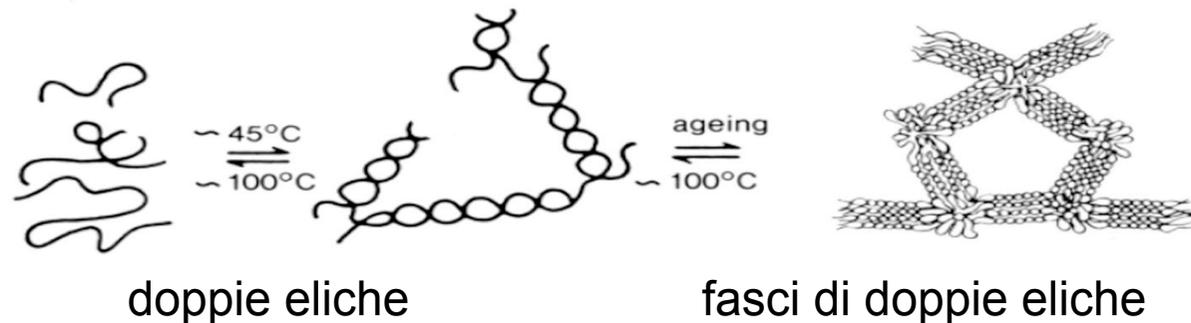
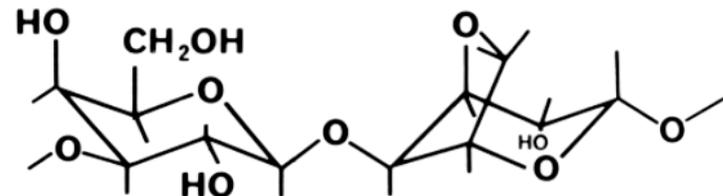
Visualizzazione dei prodotti di PCR mediante gel elettroforesi

Agarosio = DNA ed RNA --> Elettroforesi orizzontale

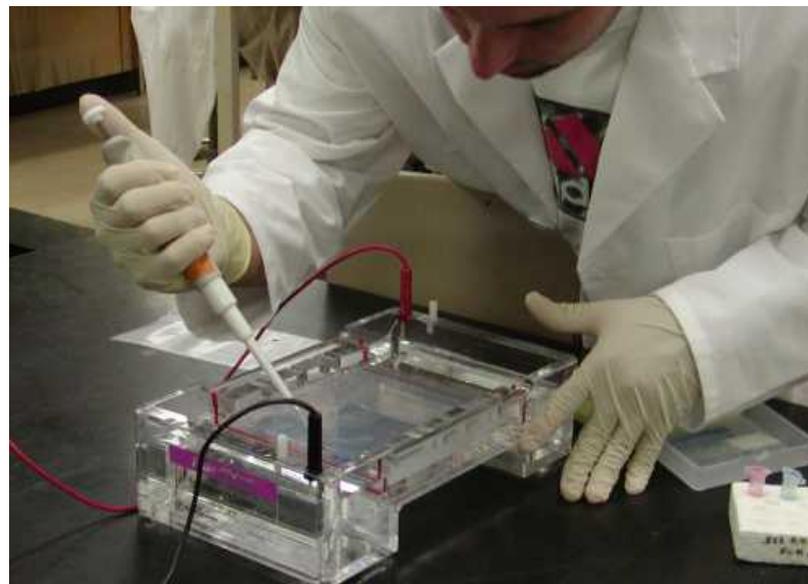
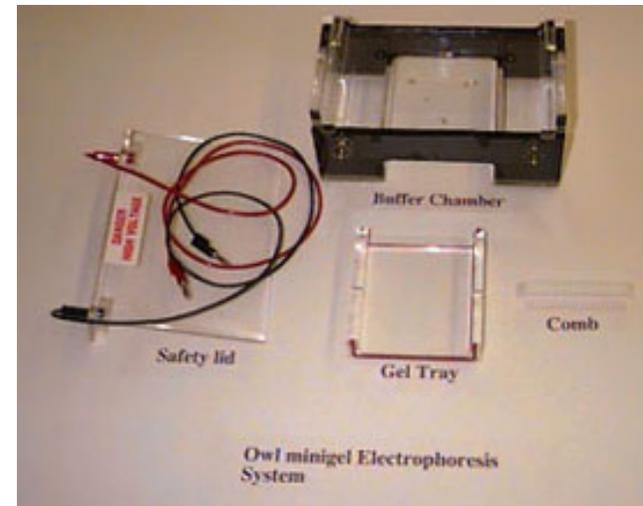
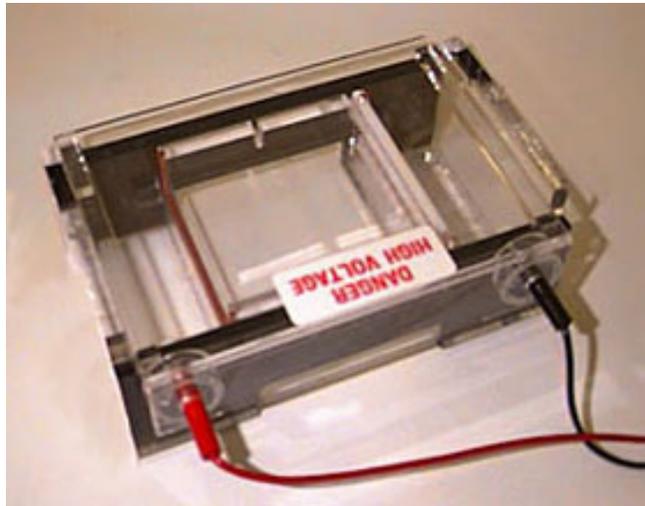
Acrilamide = DNA, RNA e proteine --> Elettroforesi verticale

Agarosio

polisaccaride naturale che si purifica da alcune alghe, polimero lineare che forma una matrice semisolida avente pori di dimensione diversa in funzione della concentrazione utilizzata.

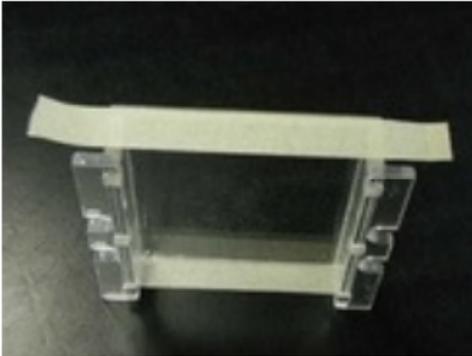


Sistemi di elettroforesi su gel d'agarosio

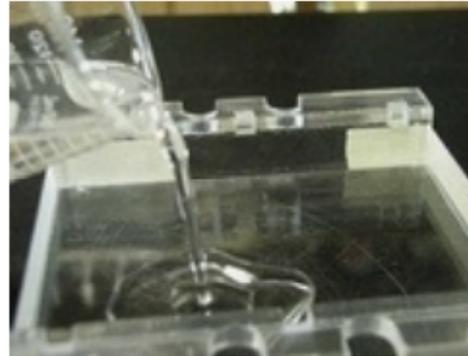


Preparazione del gel di agarosio

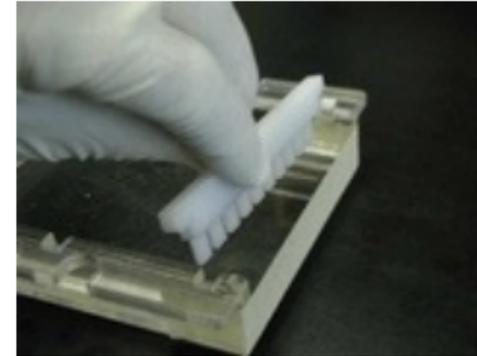
1



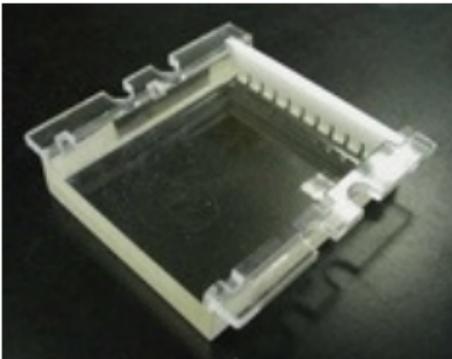
2



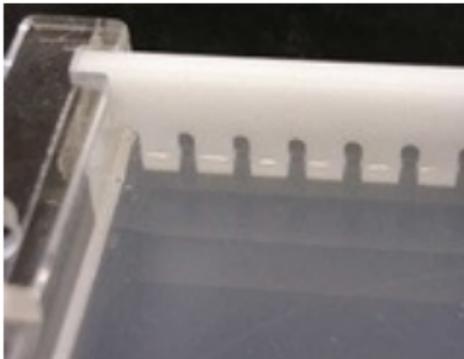
3



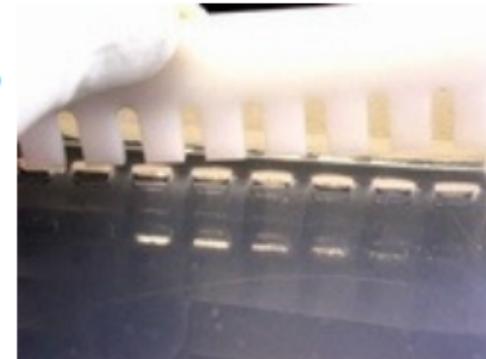
4



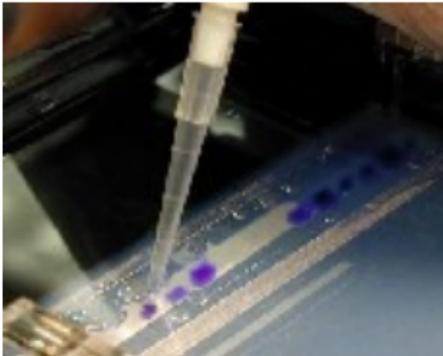
5



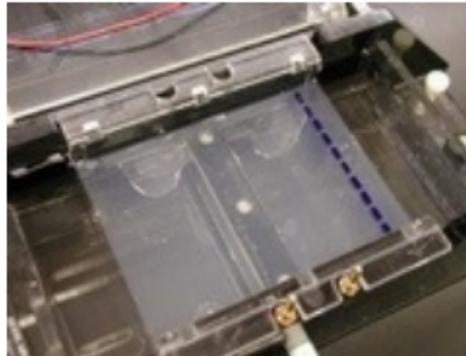
6



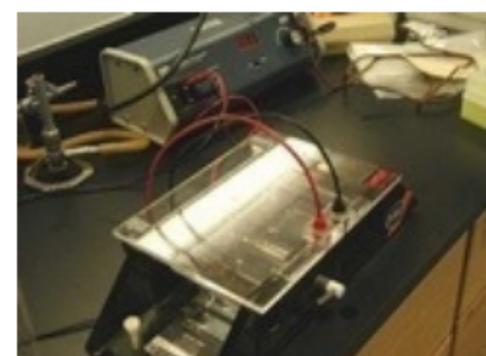
7



8

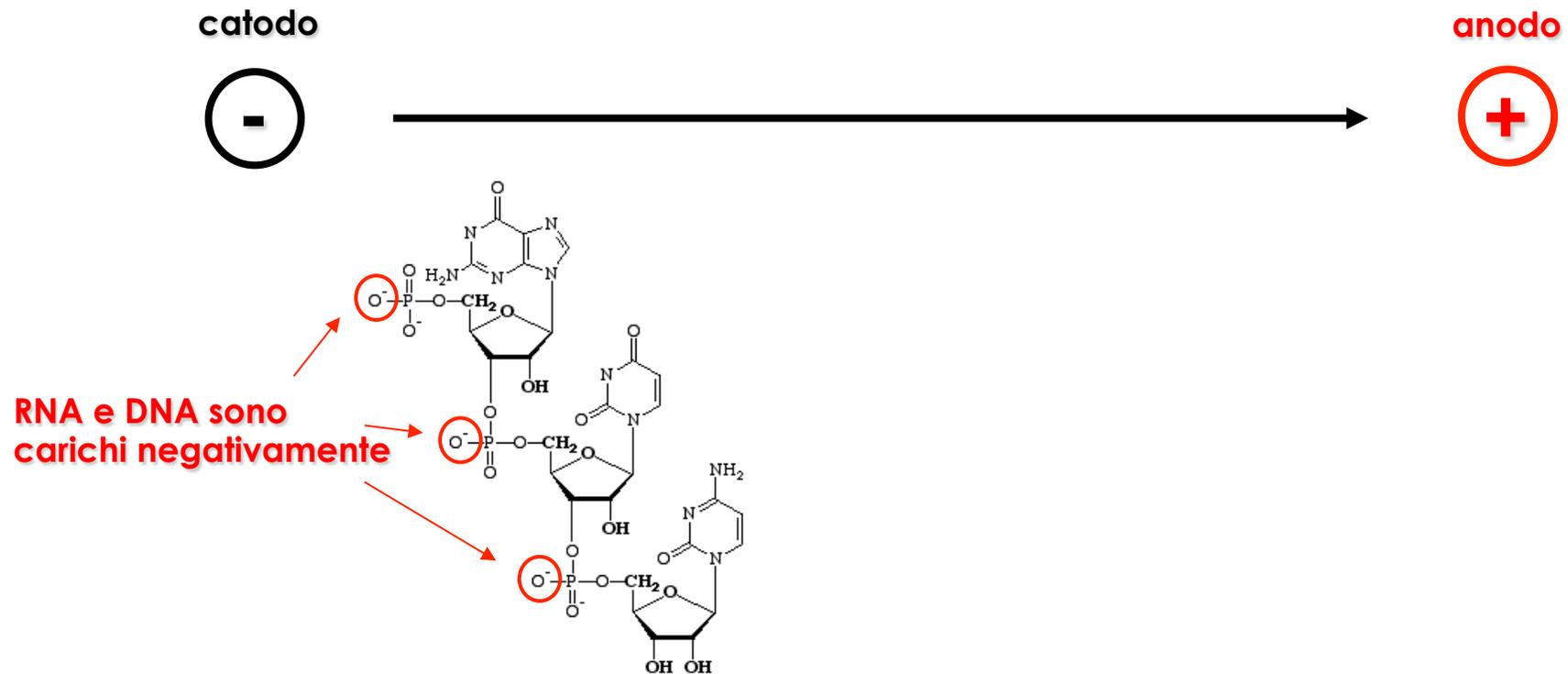


9



Visualizzazione dei prodotti di PCR

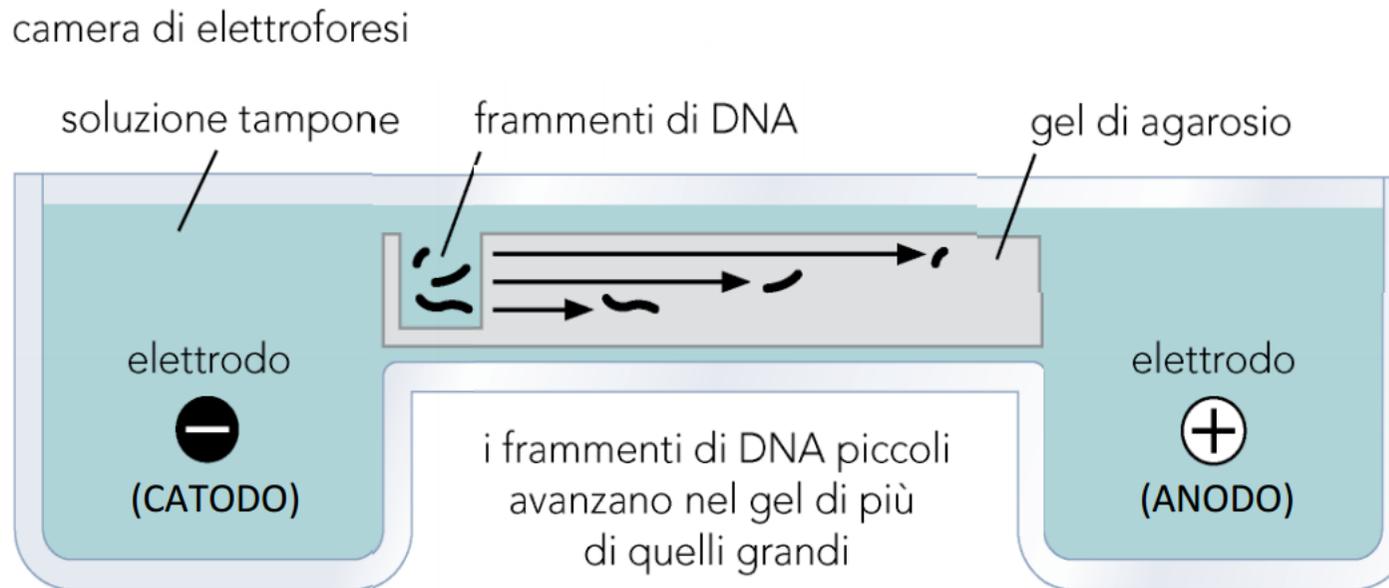
La PCR può amplificare fino ad ottenere una quantità di DNA visibile ad occhio nudo mediante gel elettroforesi.



Gel Elettroforesi

Separazione delle molecole per dimensione:

le molecole più piccole migrano nel gel più velocemente

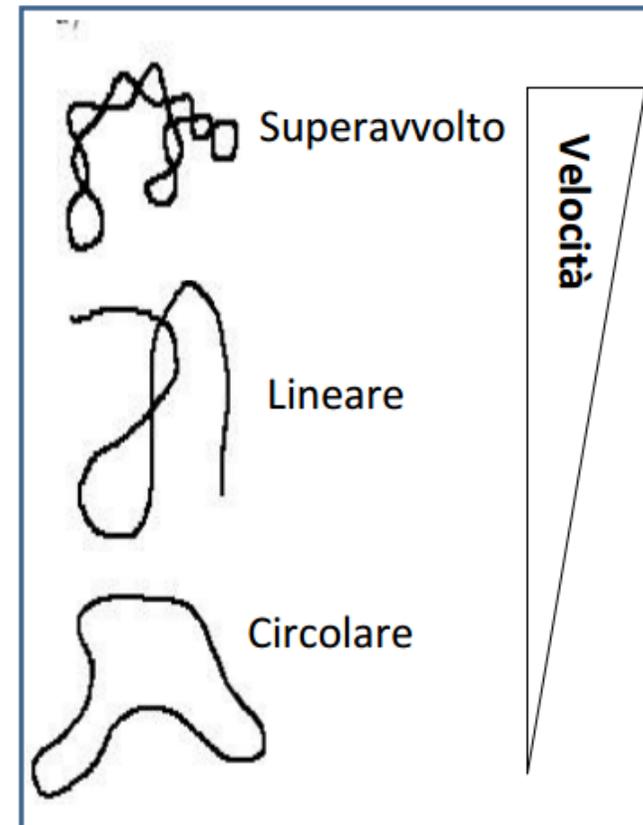


VOLTAGGIO APPLICATO circa 5 Volt/cm (distanza anodo-catodo)

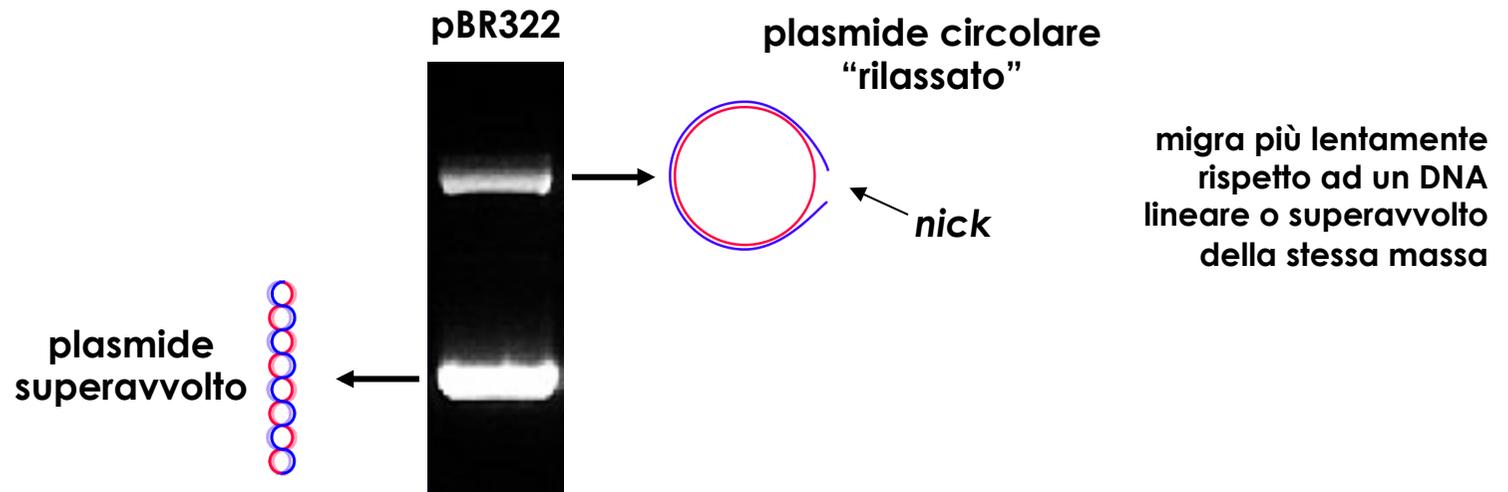
□ CONFORMAZIONE DEL DNA

DNA superavvolto, lineare e circolare hanno velocità di migrazione diversa anche se di dimensione uguale:

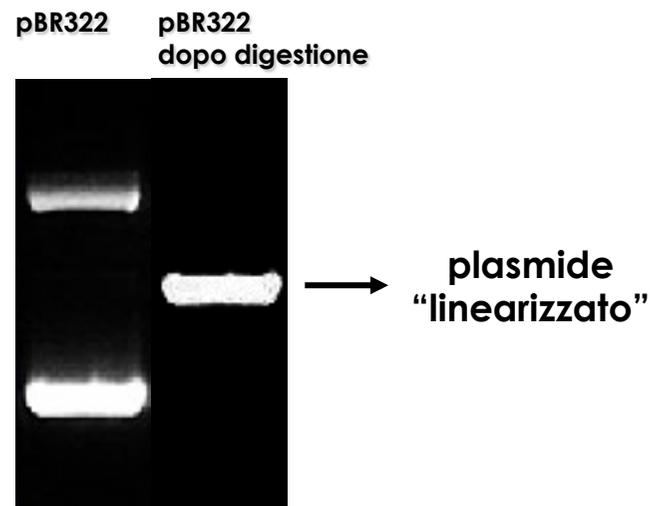
- La forma SUPERAVVOLTA corre più veloce perché è più compatta;
- La forma CIRCOLARE corre più lenta perché è la più “ingombrante” e fa più fatica a muoversi all’interno dei pori del gel;
- La forma LINEARE si colloca a metà (la forma lineare è, ad esempio, quella che si ritrova come prodotto nella PCR).



Non tutte le molecole di DNA sono lineari (es.: plasmidi batterici)



Sebbene le due forme abbiano le stesse dimensioni, esse migreranno in maniera differente



Concentrazione e range di separazione

PERCENTAGE OF AGAROSE IN GEL	EFFICIENT RANGE OF SEPARATION
0.3 %	5 kb – 60 kb
0.6 %	1 kb – 20 kb
0.7 %	800 bp – 10 kb
0.9 %	500 bp – 7 kb
1.2 %	400 bp – 6 kb
1.5 %	200 bp – 3 kb
2.0 %	100 bp – 1.2 kb

La concentrazione di agarosio nel gel ne determina il potere risolutivo

Visualizzazione DNA

Il DNA viene visualizzato attraverso colorazione con intercalanti del DNA (Etidio Bromuro, GelRed, GelGreen etc.)

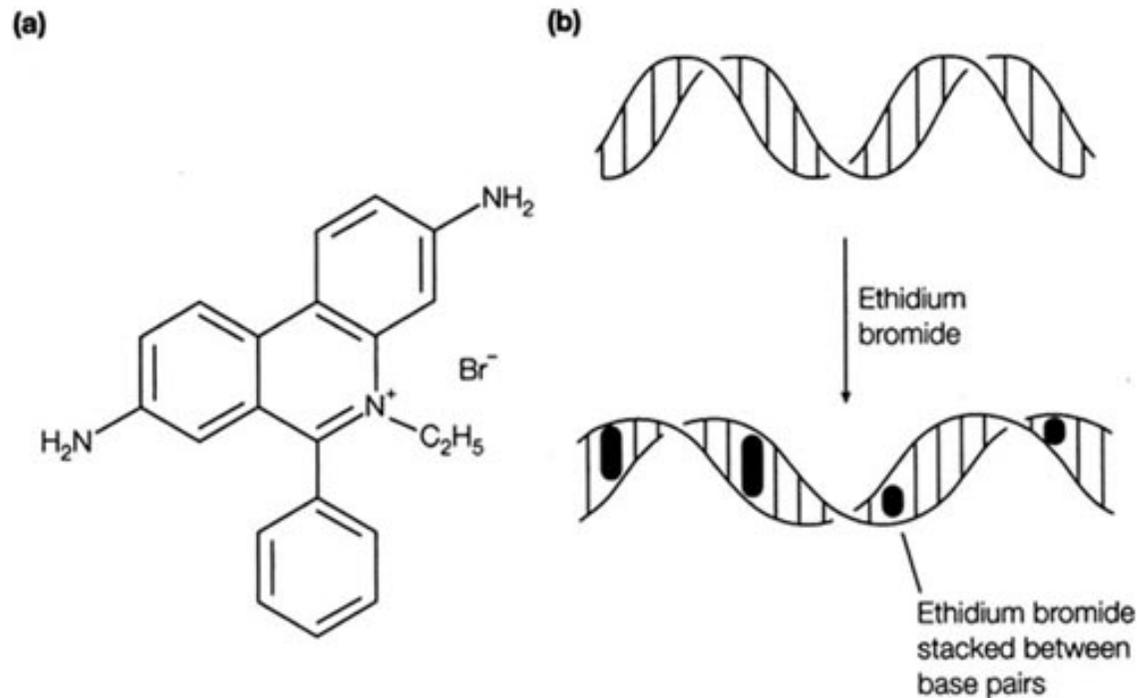
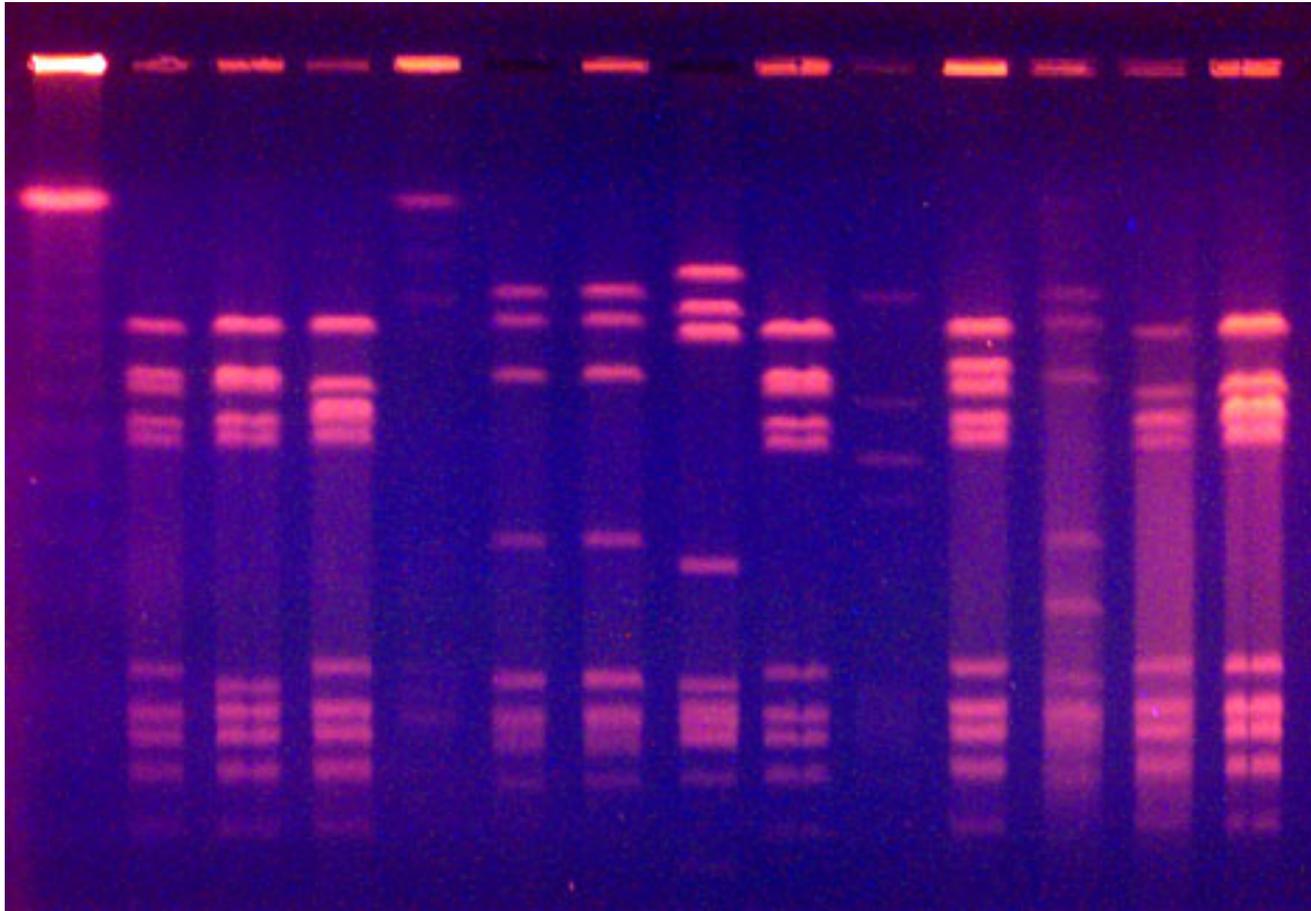


Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.



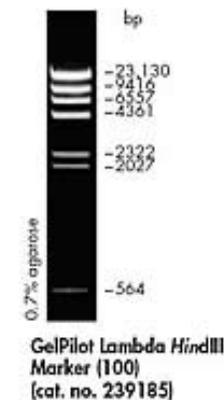
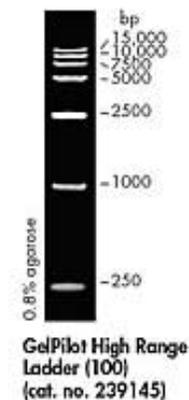
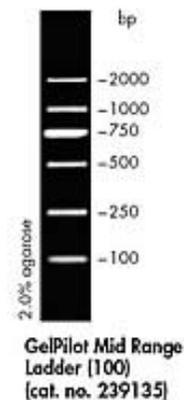
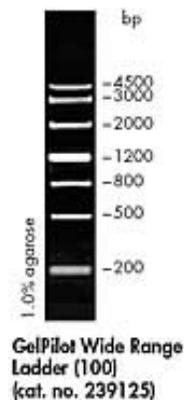
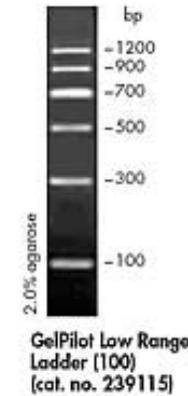
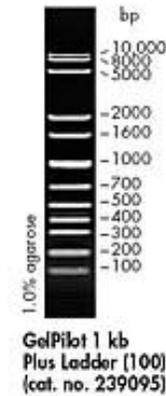
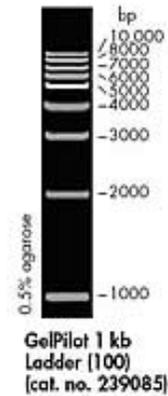
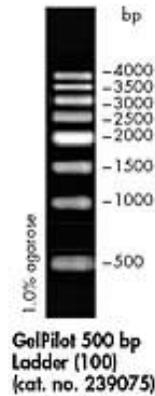
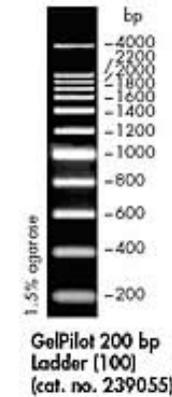
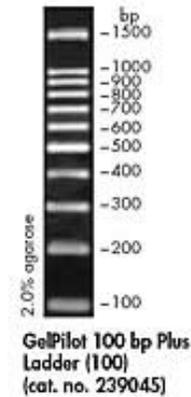
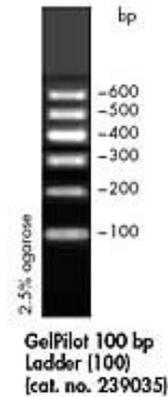
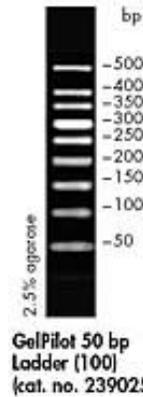
Il DNA colorato con bromuro di etidio emette una fluorescenza di colore rosso-arancio se sottoposto a luce UV

Gel di agarosio con EtBr ai raggi UV

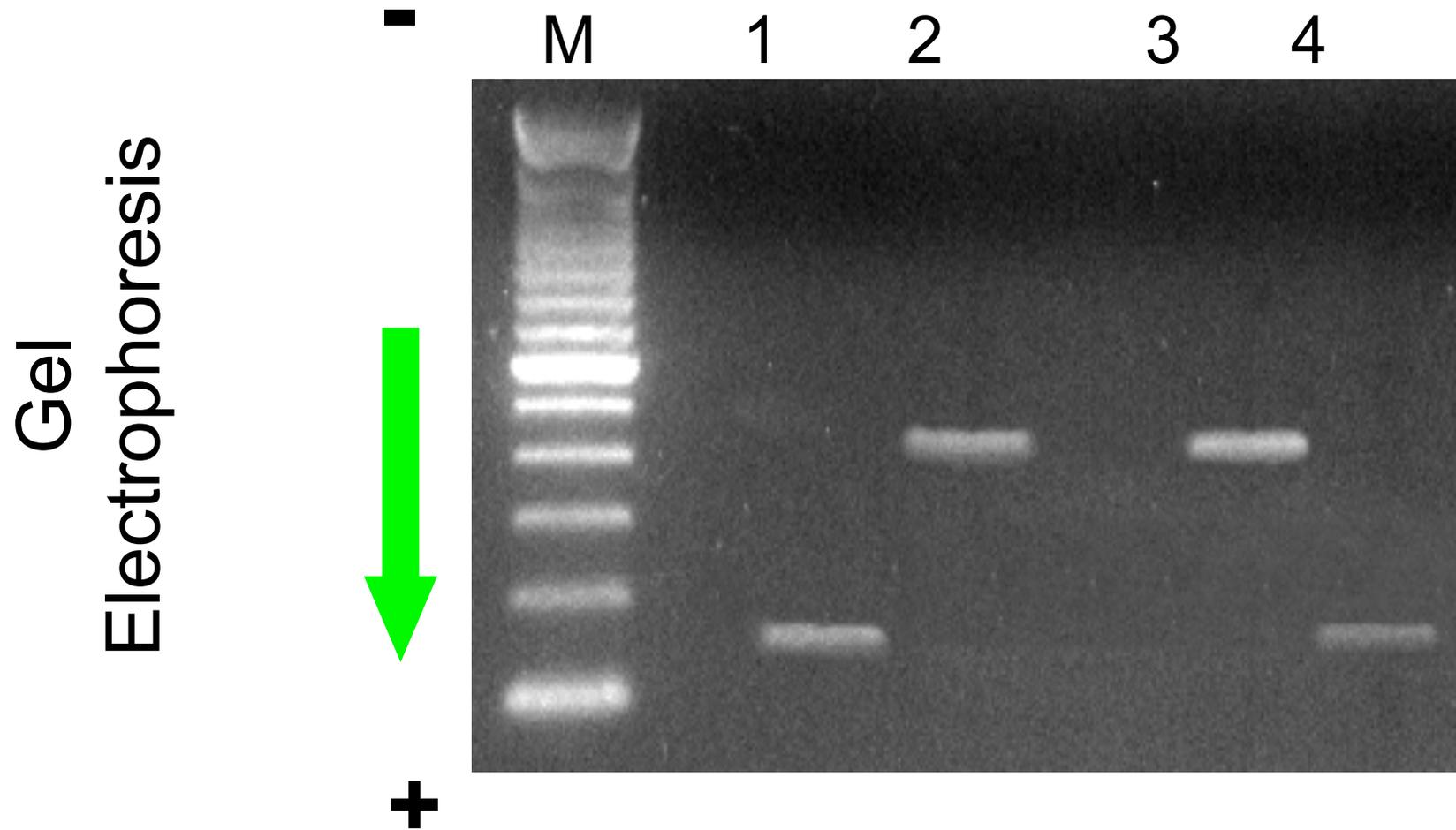


Ogni banda è costituita da milioni di molecole di DNA tutte delle stesse dimensioni!

Per definire le dimensioni delle bande nel gel, si utilizzano i marcatori di peso molecolare o DNA ladder



Analisi di prodotti di PCR



Le componenti di reazione: DNA

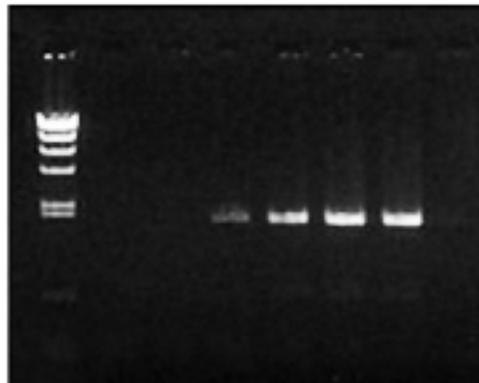
Volume di reazione: da 10 a 50 μl (max 100 μl) per una preparativa.

Il DNA (templato):



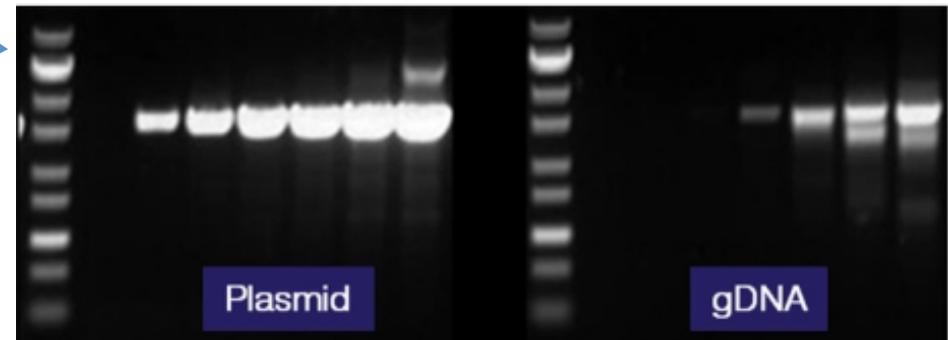
Omogeneo (plasmide purificato):
ogni molecola è identica e
rappresenta la sequenza da
amplificare

Mk NTC 0.1 1 10 100 200 500 ng



Eterogeneo (mix di diverse molecole di DNA) come il DNA genomico estratto da cellule o materiale biologico.

pg ng pg ng
0.5 5 50 0.5 5 50 80 400 2 10 50 250



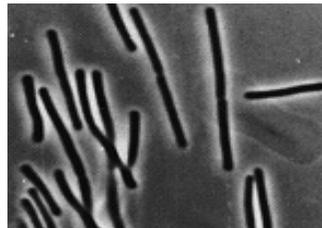
Le componenti per la reazione: l'enzima

La Taq polimerasi:

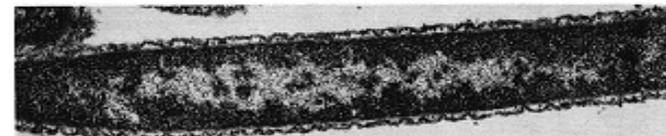
DNA polimerasi di “*Thermophilic eubacterium thermus aquaticus*” resiste a 95°.

NB: Emivita *Taq* polimerasi: 30 min a 95°C (30 cicli da 1 minuto di denaturazione a 95°C)

Una **unità** è definita come la quantità di enzima che incorpora 10 nmol di dNTP in DNA insolubile in 30 minuti alla T° ext (varia da enzima a enzima).



**Hot water bacteria:
Thermus aquaticus
Taq DNA polymerase**



Le componenti per la reazione: l'enzima

TABLE 6.1. Thermostable DNA polymerases differ in their enzymatic activities

Enzyme	Relative efficiency ^a	Error rate ^b	Processivity ^c	Extension rate ^d	3' to 5' exo	5' to 3' exo
<i>Taq</i> Pol	88	2×10^{-4}	55	75	no	yes
<i>Tli</i> Pol (Vent)	70	4×10^{-5}	7	67	yes	no
<i>Pfu</i> Pol	60	7×10^{-7}	n.d.	n.d.	yes	no
<i>rTth</i>	n.d.	n.d.	30	60	no	yes

^a Percent conversion of template to product per cycle.

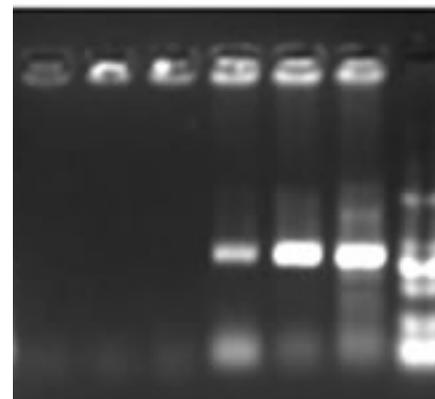
^b Frequency of errors per base pairs incorporated.

^c Average number of nucleotides added before dissociation.

^d Average number of nucleotides added per second.

n.d = not determined.

0.1U 0.3U 0.6U 1U 2U 4U M



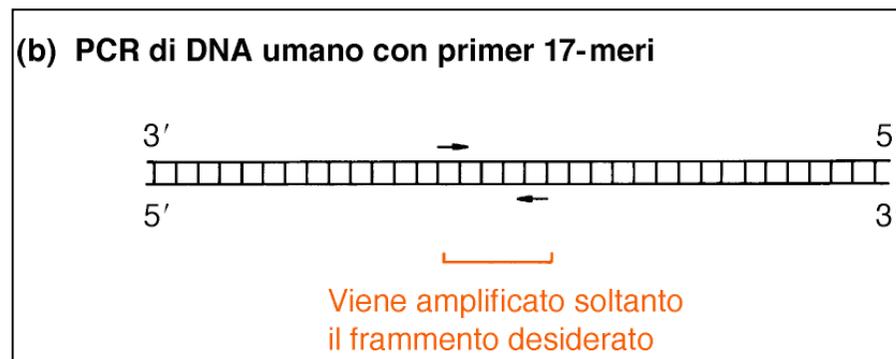
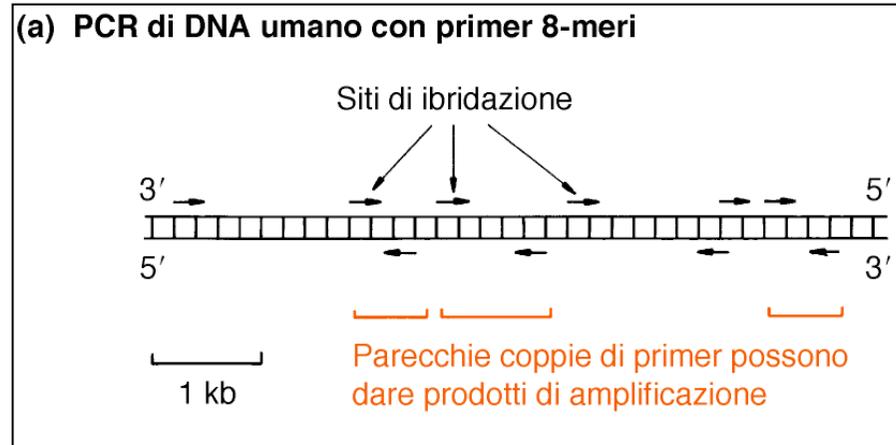
Effetto della
concentrazione di Taq

Le componenti di reazione: Primer

Oligonucleotidi o primer:

- Estrema cura nella scelta della regione da amplificare
- Evitare sequenze inusuali come serie di purine o pirimidine
- Lunghezza: 20-30 paia di basi (non meno di 16 bp)

La lunghezza dei primer è cruciale per la specificità della PCR



La lunghezza dei primer determina la specificità del loro legame al DNA stampo

La probabilità di trovare una certa sequenza casualmente nel genoma diminuisce all'aumentare della sua lunghezza

5' -GATC-3'
3' -CTAG-5'



4 bp: La probabilità è $(1/4)^4 = 1/256$ comune

5' -GATCGATCGGATCCCATATG-3'
3' -CTAGCTAGCCTAGGGTATAC-5'

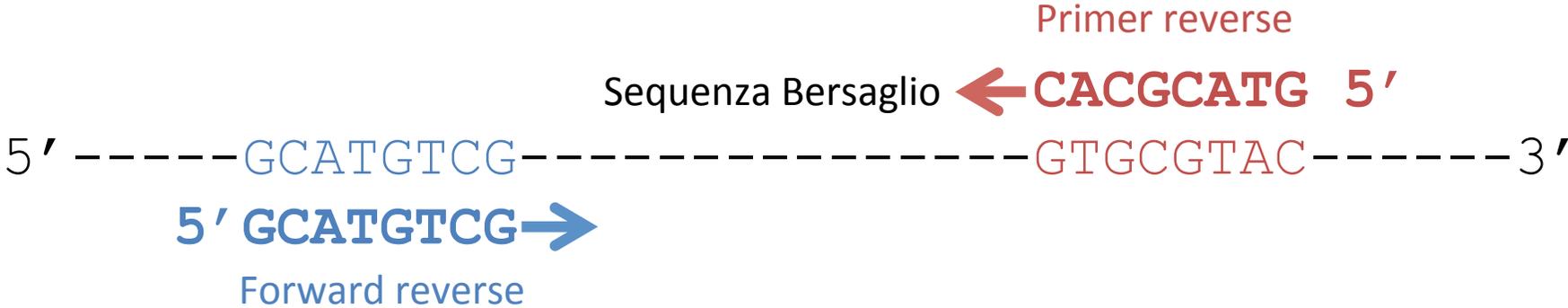
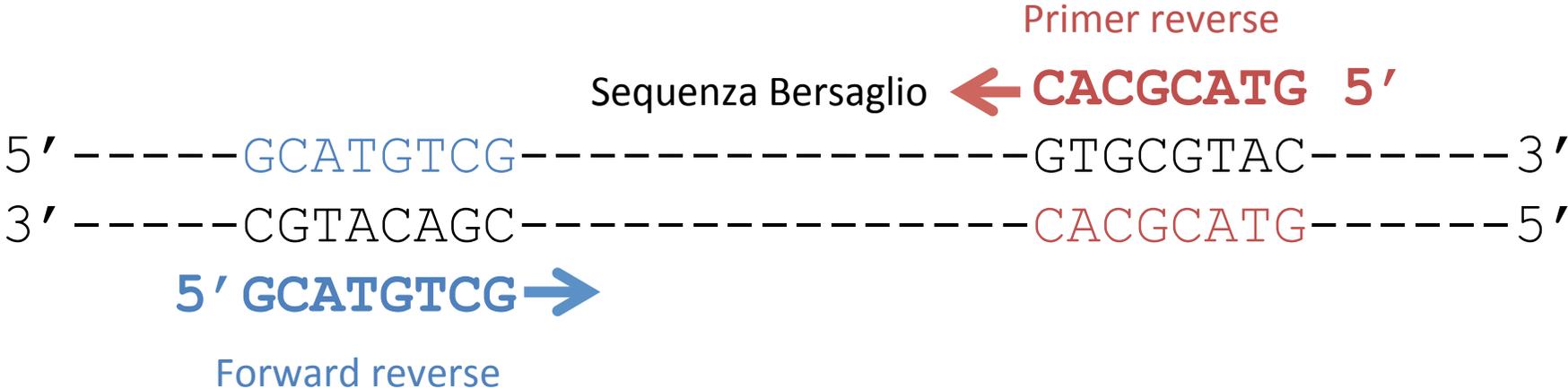


20 bp: La probabilità è $(1/4)^{20} = 1/10^{12}$



Genoma di *E. coli* genome (4.6×10^6 bp);
Genoma umano (3×10^9 bp)

Progettazione dei primer



Le componenti di reazione: Primer

Oligonucleotidi o primers:

- Estrema cura nella scelta della regione da amplificare
- Evitare sequenze inusuali come serie di purine o pirimidine
- Lunghezza: 20-30 paia di basi (non meno di 16 bp)
- Le sequenze non devono essere tra loro complementari per il rischio di formazione di dimeri o hairpins

5' -ACCGGTAGCCACGAATTCGT-3'

|||||
3' -TGCTTAAGCACCGATGGCCA-5'

5' -GTTGACTTGATA

||||| T
3' -GAACTCT

- Equilibrato rapporto AT/GC (45–55%)
- T melting comprese tra 45-68° C
- T melting simili (max +/- 2° C)

Annealing

INCONTRO E IBRIDAZIONE TARG

FASE PIÙ DELICATA DELLA Calcolo della temperatura

Calcolo della Tm:

- Uso di sofisticati algoritmi
- Uso della formula $2 \cdot (A+T) + 4 \cdot (C+G)$

News: Try out our new tool: [Wiley-DNA-Editor](#) - A DNA/Plasmid editor running in your browser!

Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

[More...](#) [Source Code](#)
[Help](#) [About](#)

Load server settings: Default Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.

Task: generic

Main | General Settings | Advanced Settings | Internal Oligo | Penalty Weights | Advanced Sequence

Sequence Id:

Paste template sequence below Or upload sequence file: Nessun file selezionato

Mark selected region:

Excluded Regions: < >
Targets: []
Included Region: { }
Primer overlap positions: -
Pair OK Region List:

Pick left primer Pick hybridization probe Pick right primer

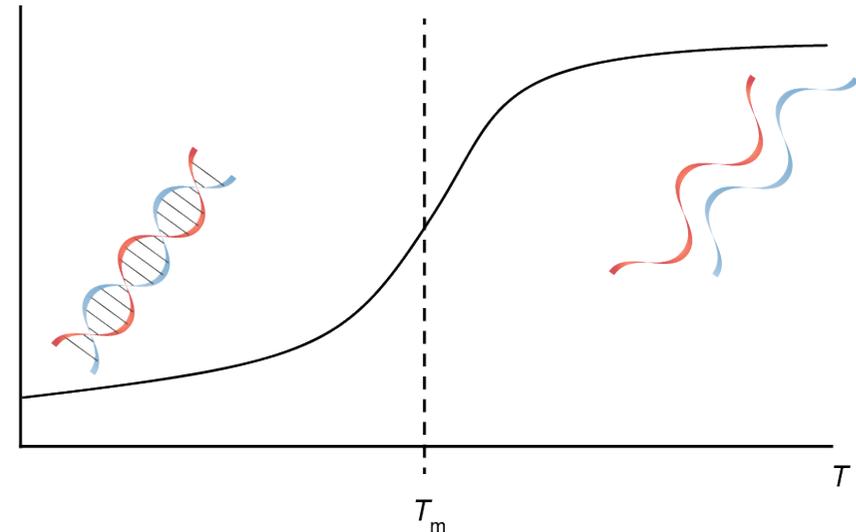
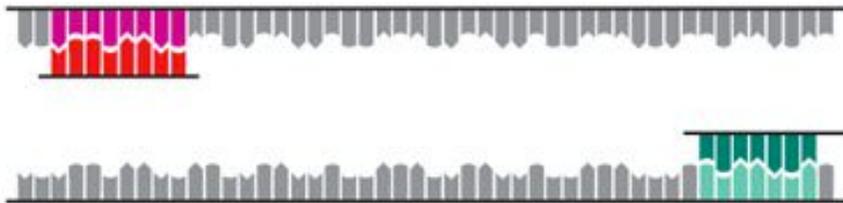
or use left primer below. (internal oligo) or use oligo below. or use right primer below (5'->3' on opposite strand).

© by A. Untergasser : [Contact](#) : [Datenschutzerklärung](#) : [Impressum](#)

Messa a punto
empirica

T_m vs T_a

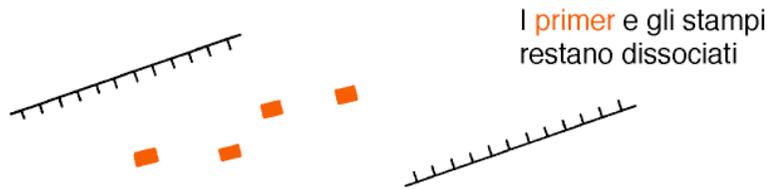
La **temperatura di melting** è quella alla quale il 50% degli oligonucleotidi ed il suo complementare sono sotto forma di duplex.



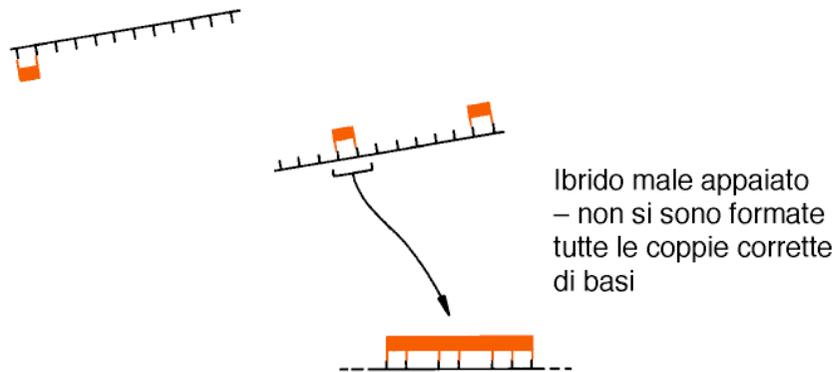
La **temperatura di annealing** nella PCR è una temperatura inferiore di qualche grado (4-6) rispetto alla temperatura di melting. È utilizzata per aumentare la probabilità di legame dei primer allo stampo.

Ottimizzazione della Temperatura di annealing

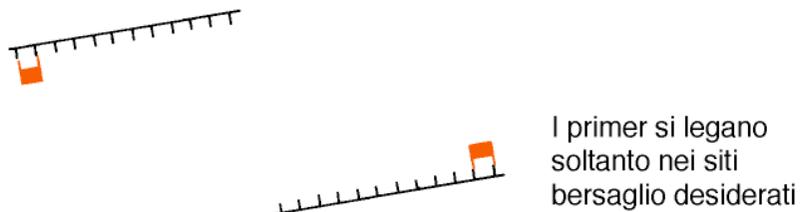
(a) Temperatura di annealing troppo alta



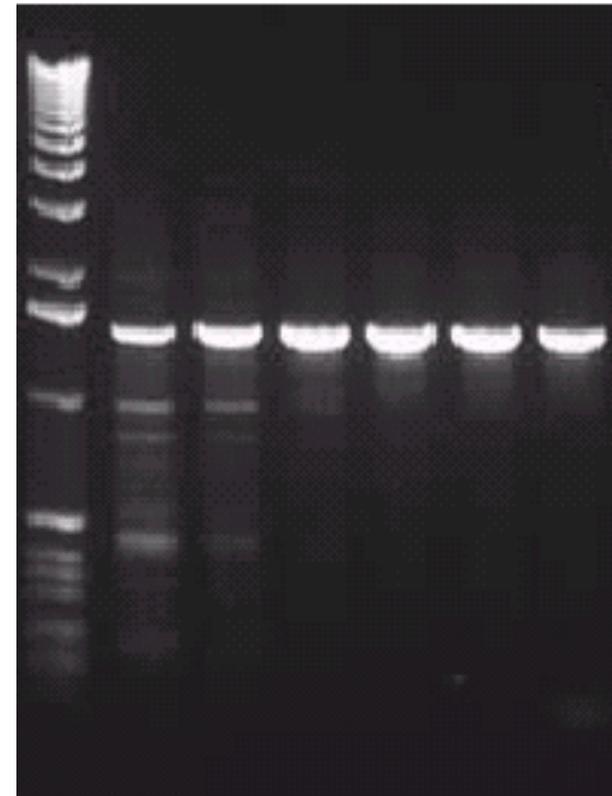
(b) Temperatura di annealing troppo bassa



(c) Temperatura corretta di annealing



M 50 52 54 56 58 60



Le componenti di reazione: dNTPs e Sali

dNTPs: conc. standard 200 μM per ognuno

Il tampone: Sali (MgCl_2); ogni Taq polimerasi ha un tampone con concentrazioni saline ideali.

[Mg²⁺]

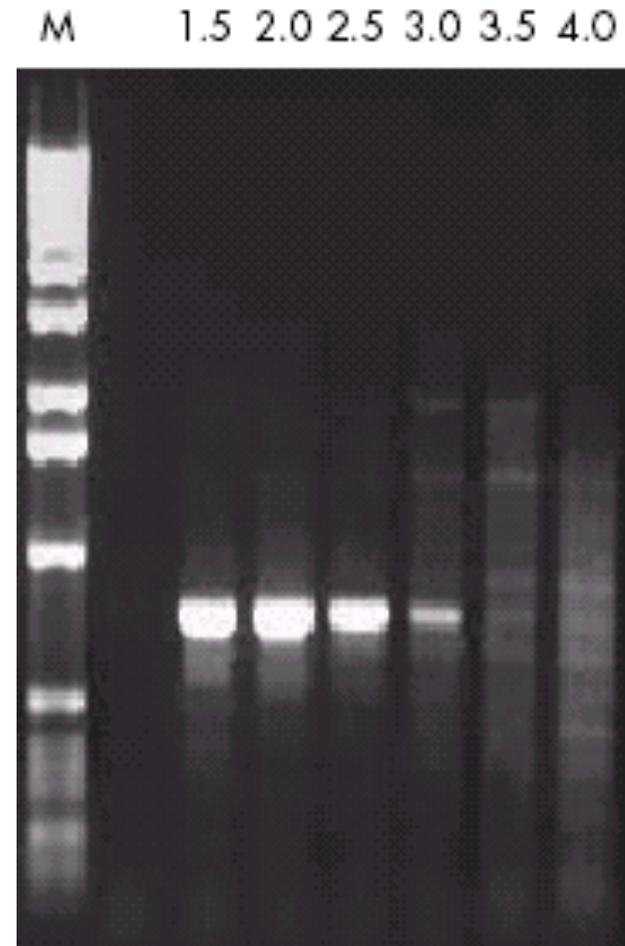
- Necessario per l'attività enzimatica
- Stabilizza l'ibridazione del DNA
- Sottratto alla reazione da diversi fattori: DNA, EDTA, dNTPs.

Questo parametro va ottimizzato empiricamente

Ottimizzazione della PCR: la concentrazione di Mg^{2+}

- La fedeltà di una reazione di PCR dipende da $[Mg^{2+}]$.
- Variare $[Mg^{2+}]$ di 0.5 mM per la messa a punto.
- Qualche volta è necessario raggiungere un compromesso fra resa e specificità.

La concentrazione utilizzata è solitamente 0.5-5 mM, (generalmente 1.5 mM)



$[Mg^{2+}]$  → Specificità  Efficienza 

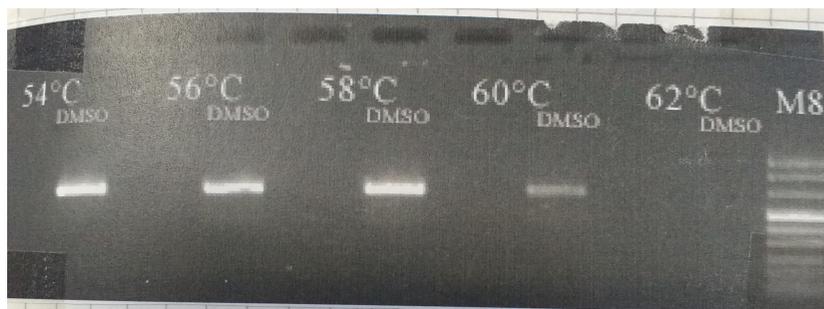
Ottimizzazione della reazione di PCR

- Temperatura di annealing dei primer
- Concentrazione di Mg^{2+} nella reazione
- La quantità di stampo e la polimerasi

- (The extension time) : 1min/Kb di amplificato
- (The denaturing and annealing times)
- (The extension temperature) 68-72°C a seconda dell'enzima
- L'uso di additivi per aumentare l'efficienza delle reazione

Enhancer and Inhibitor of PCR

Enhancer	Inhibitor
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Phenol
Glycerol	Sodium dodecyl sulfate (SDS)
Formamide	Proteinase K
Bovine serum albumin (BSA)	Heparin
Polyethylene glycol 6000 (PEG)	Porphyrin
Tween 20	EDTA
Gelatin	



Quanto grande può essere il target?

- I prodotti di amplificazione hanno una dimensione tipicamente che oscilla fra 100-1500 bp.



- Target più lunghi sono comunque amplificabili → 25 kb, ma
 - Richiedono buffer di amplificazione modificati, cocktails di polimerasi, e tempi di estensione più lunghi;
 - esistono dei limiti legati all'integrità del materiale di partenza (più è frammentato < sarà la probabilità di ottenere frammenti lunghi.

Fedeltà della reazione

- La *Taq* DNA polimerasi manca di attività proofreading 3' → 5' comunemente presente in altre polimerasi.
- La *Taq* misincorpora 1 base ogni 10⁴.
- Un target di 400 conterrà un errore nel 33% delle molecole amplificate dopo 20 cicli.
- La distribuzione degli errori sarà casuale.

Gli errori sono rilevanti?



- Se si vuole sequenziare il prodotto amplificato o tagliarlo con un enzima di restrizione



- Se si vuole clonare il DNA amplificato. Una singola molecola può portare diverse mutazioni

Fedeltà della reazione

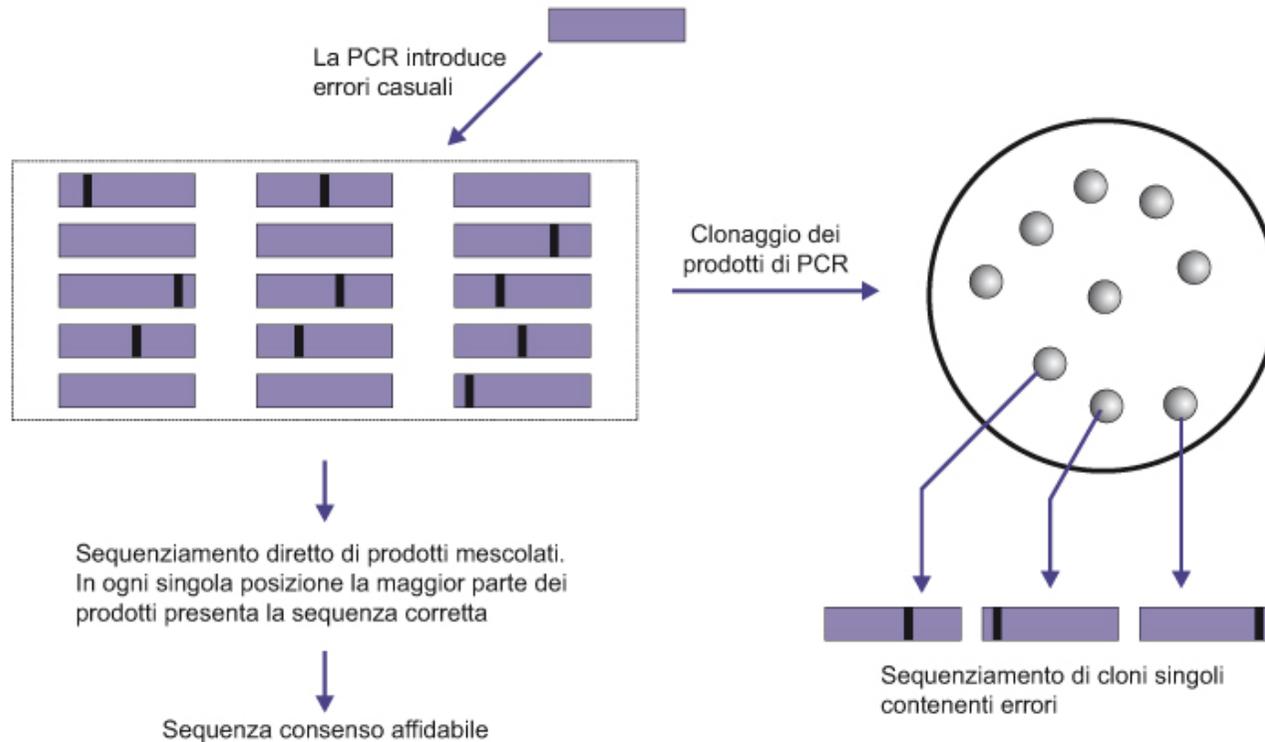
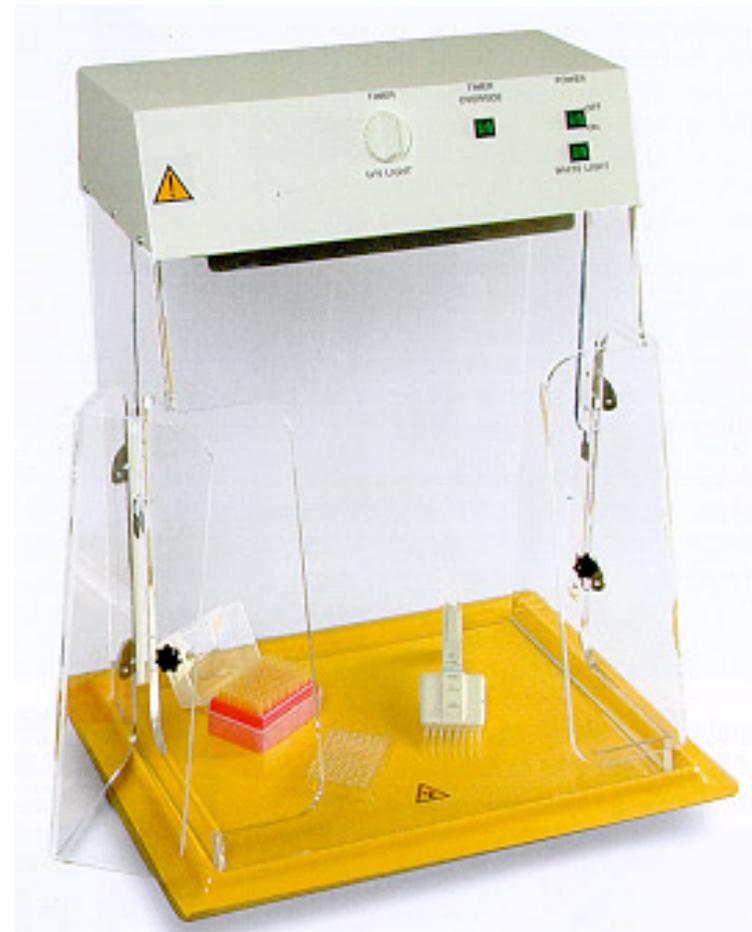


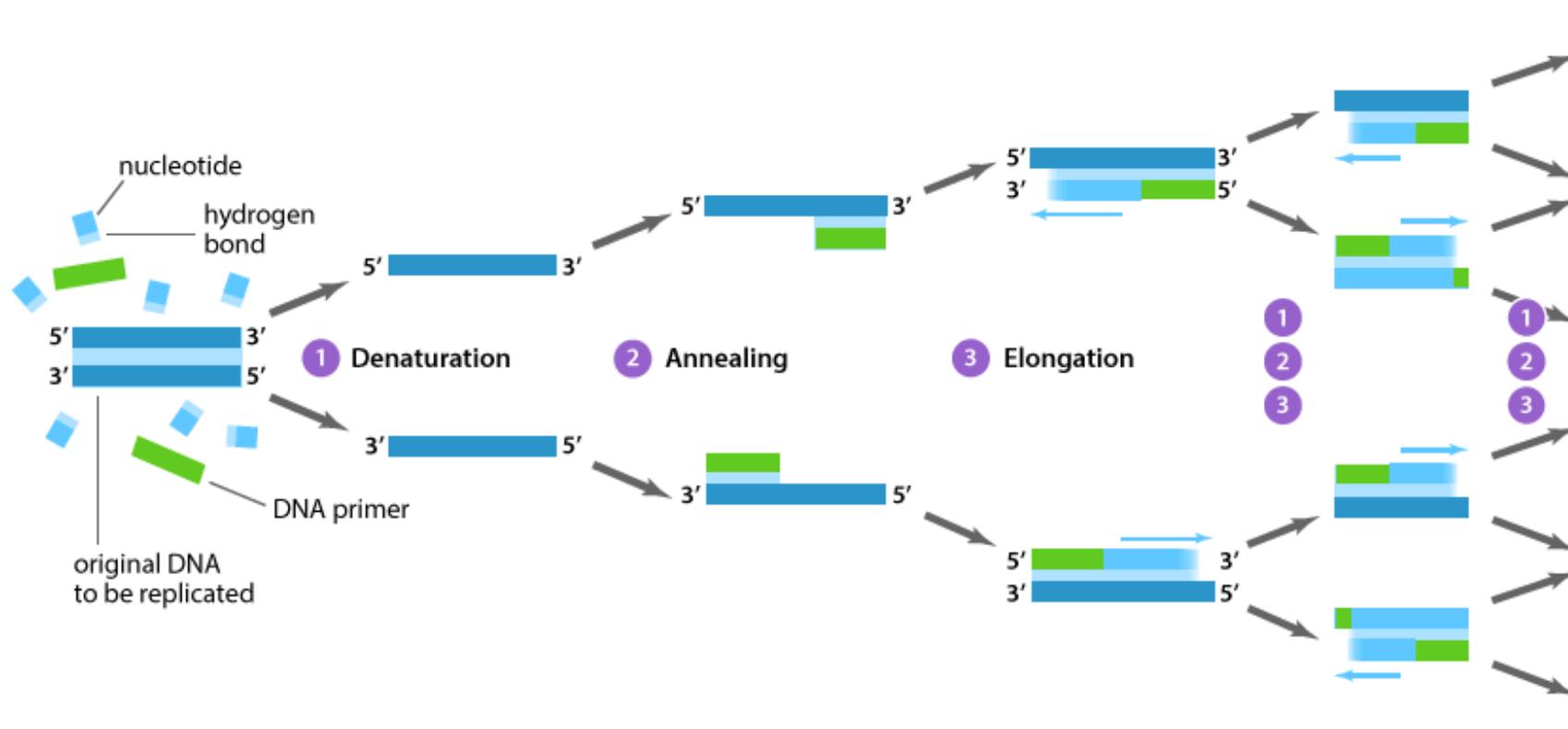
Figura 4.7 Identificazione di errori dovuti alla PCR.

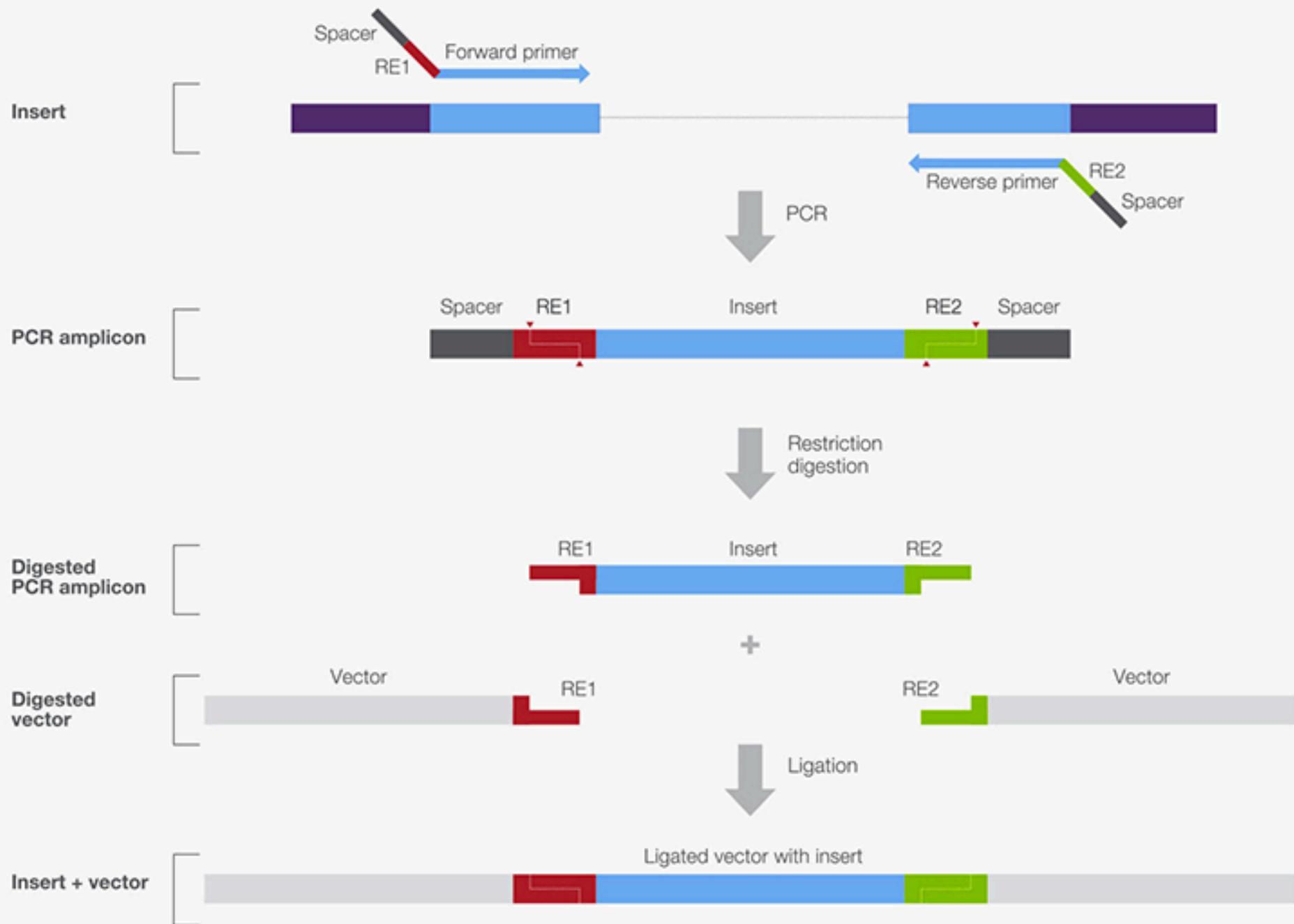
La PCR è estremamente sensibile per cui vi è un elevato rischio di contaminazioni

Controlli, controlli, controlli !!!
(negativi e positivi)



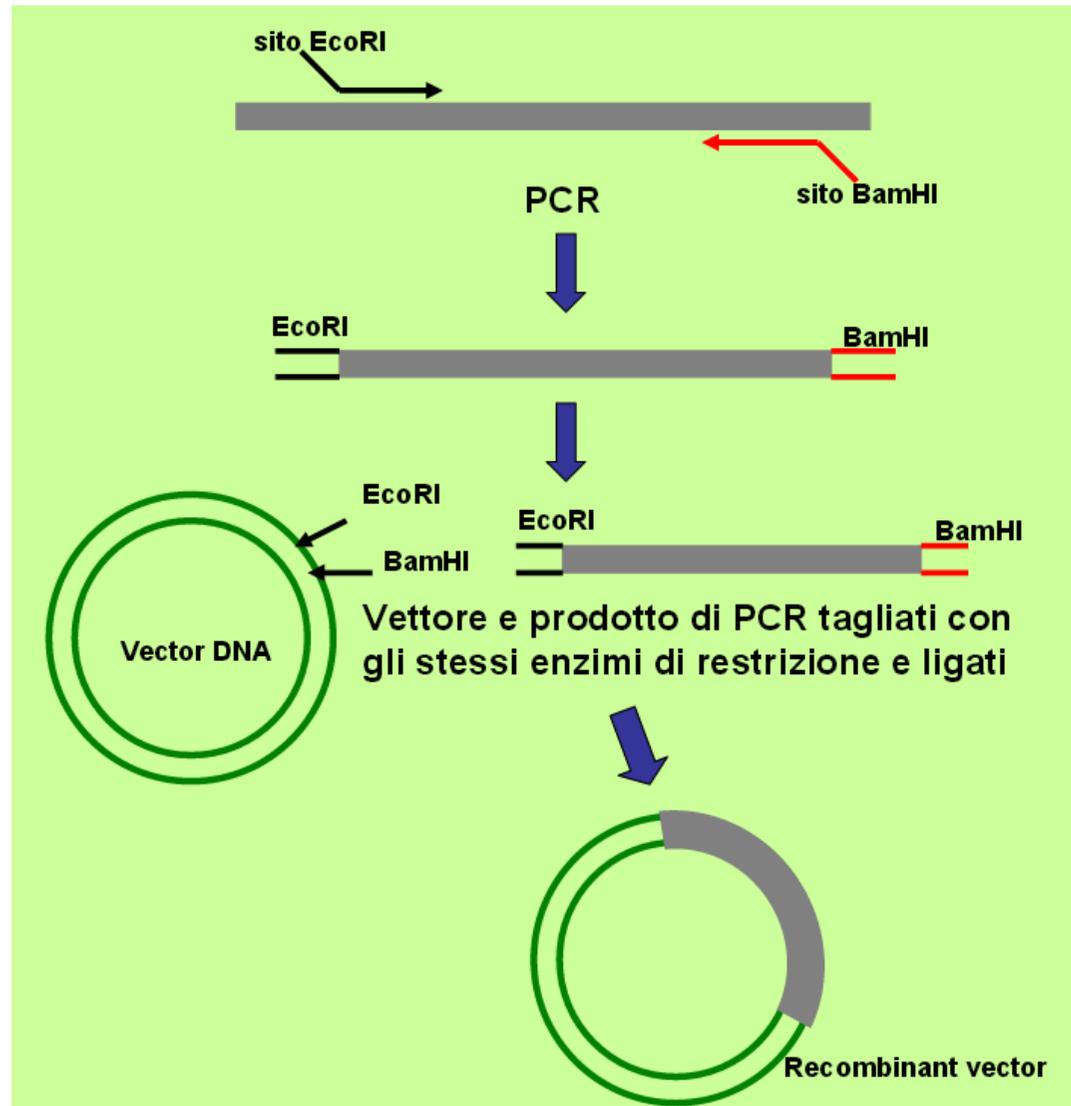
Clonaggio dei prodotti di PCR





Clonaggio dei prodotti di PCR (1)

- Progettazione di primers con code contenenti siti di restrizione specifici.

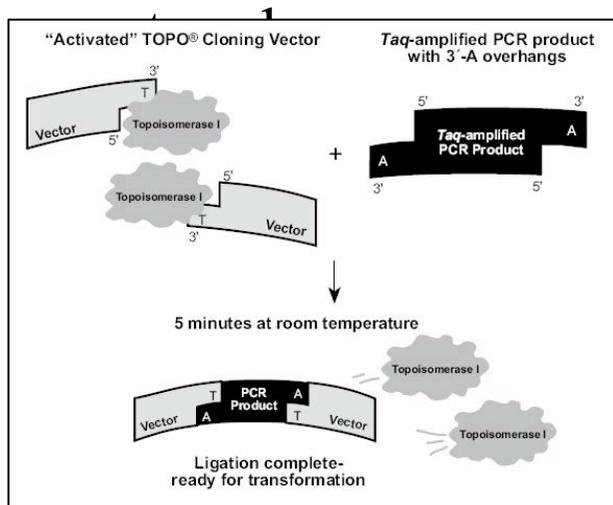
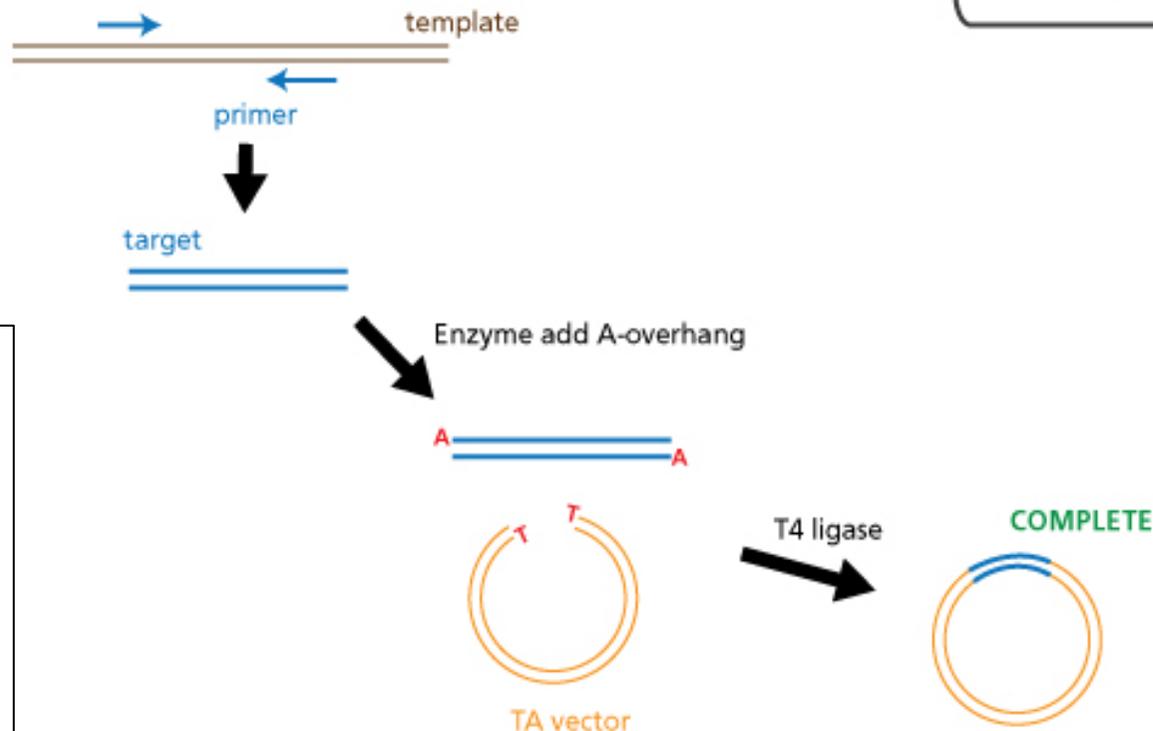


Clonaggio dei prodotti di PCR (2)

TA cloning: la Taq polimerasi tende ad aggiungere un nucleotide adenosina all'estremità 3'-OH di ciascuno

5' AGACTCAGA.....AACTTATTT 3'
 3' TCTGAGTCT.....TTGAATAAA 5'

TA Cloning



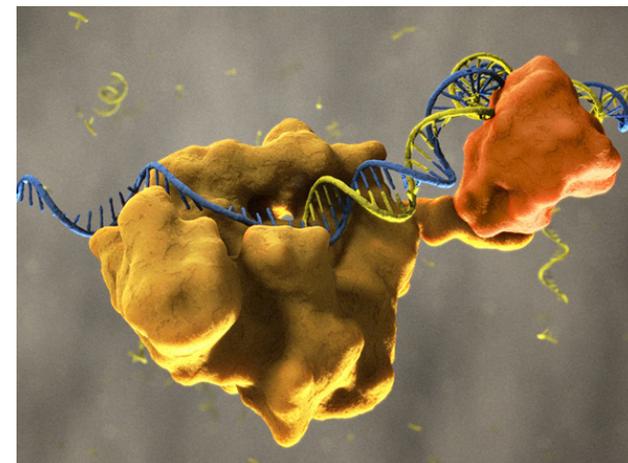
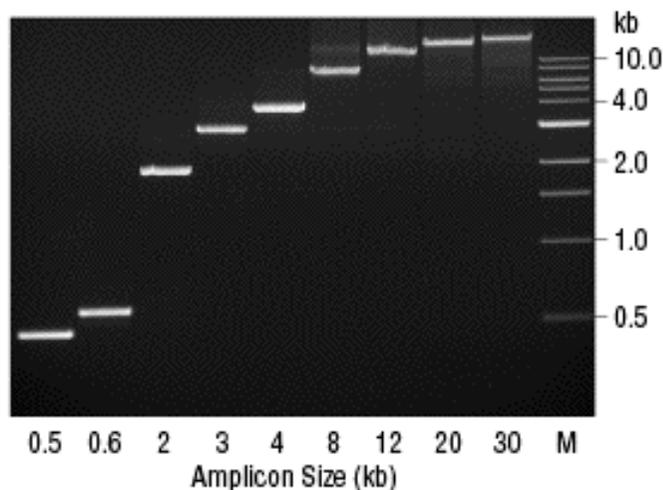
Alcune varianti al processo base di PCR

Table 7.1: Some variants of the basic PCR process

Acronym	Technique name	Application
RT-PCR	Reverse transcriptase PCR	PCR from mRNA templates
IPCR	Inverse PCR	PCR of sequences lying outside primer binding sites
RAPD-PCR	Random amplified polymorphic DNA PCR	Genomic fingerprinting under low-stringency conditions
AP-PCR	Arbitrarily primed PCR	As RAPD-PCR
TAIL-PCR	Thermal asymmetric interlaced PCR	PCR using alternating high/low primer binding stringency with arbitrary and sequence-specific primers
mrPCR	Multiplex restriction site PCR	PCR using primer with restriction site recognition sequences at their 3' ends
AFLP	Amplified fragment length polymorphism	Genome analysis by PCR of restriction digests of genomic DNA
CAPS	Cleaved amplified polymorphic sequence analysis	Genome analysis for single nucleotide polymorphisms (SNPs) by PCR and restriction enzyme digestion
GAWTS	Gene amplification with transcript sequencing	PCR coupled with transcript synthesis and sequencing using reverse transcriptase
RAWTS	RNA amplification with transcript sequencing	Variant of GAWTS using mRNA templates
RACE	Rapid amplification of cDNA ends	Isolation of cDNAs from low-abundance mRNAs

Long PCR

- Prevede amplificazione di frammenti più grandi rispetto alla PCR standard (> 5 Kb, spesso 10-15 kb, ma anche 25 Kb).
- La Long PCR è utile solo se è accurata. È necessario usare miscele di polimerasi competenti ad amplificazioni lunghe con polimerasi ad alta fedeltà (per es. Pfu)
- **Applicazioni** clonare geni/frammenti grandi



Phusion® High-Fidelity DNA Polymerases

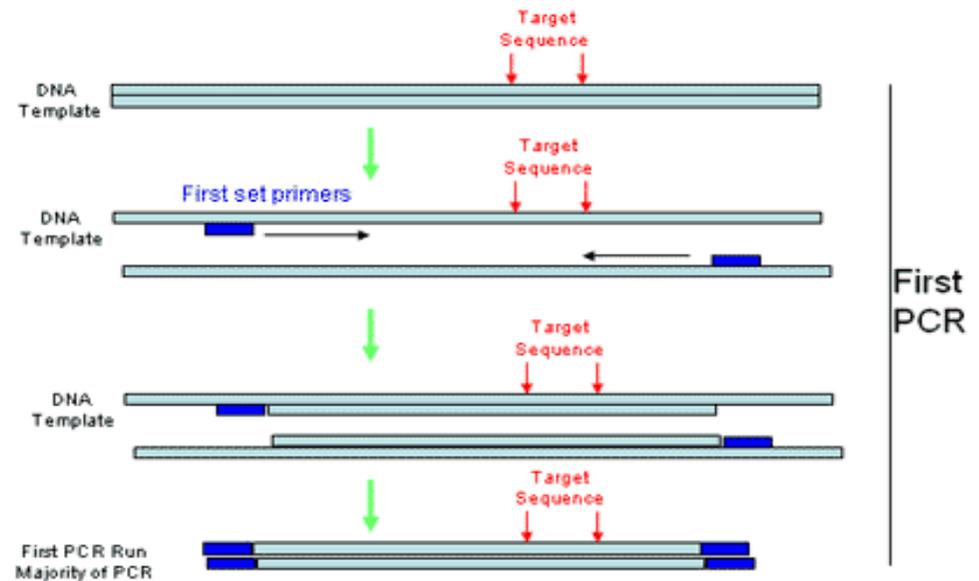
Nested PCR

Due coppie (invece che una) di primers sono utilizzati per amplificare un frammento di DNA.

La **prima coppia** amplifica un frammento con una modalità analoga a quella di una PCR standard.

La **seconda coppia** di primer (nested) si lega all'interno del primo frammento di PCR e consente l'amplificazione di un secondo prodotto di PCR più corto rispetto al primo.

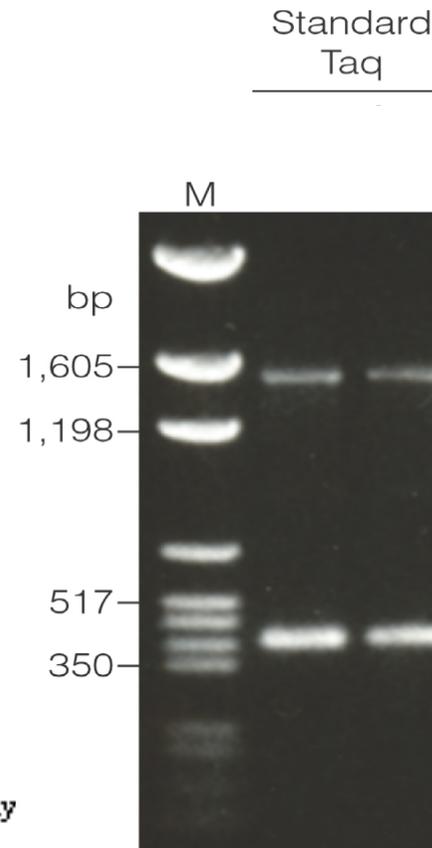
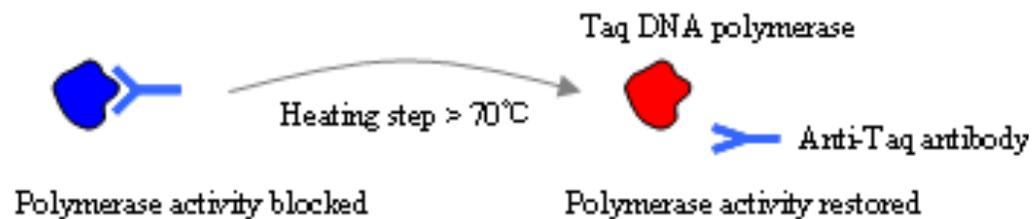
Vantaggi probabilità estremamente bassa di amplificazione non specifica



Hot-start PCR

Durante l'allestimento della reazione di PCR o durante il riscaldamento iniziale del campione si possono verificare situazioni di appaiamento non specifico fra primers e stampo.

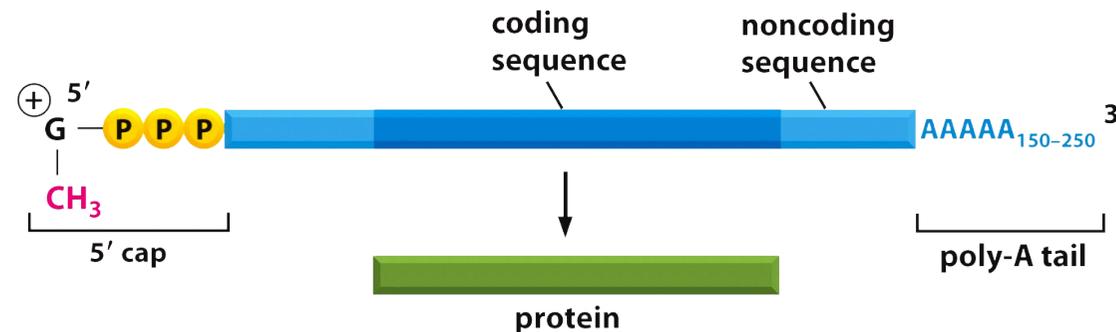
Fra 40°C e 50°C la Taq polimerasi ha un'efficiente attività polimerasica e può estendere i primers non correttamente appaiati.



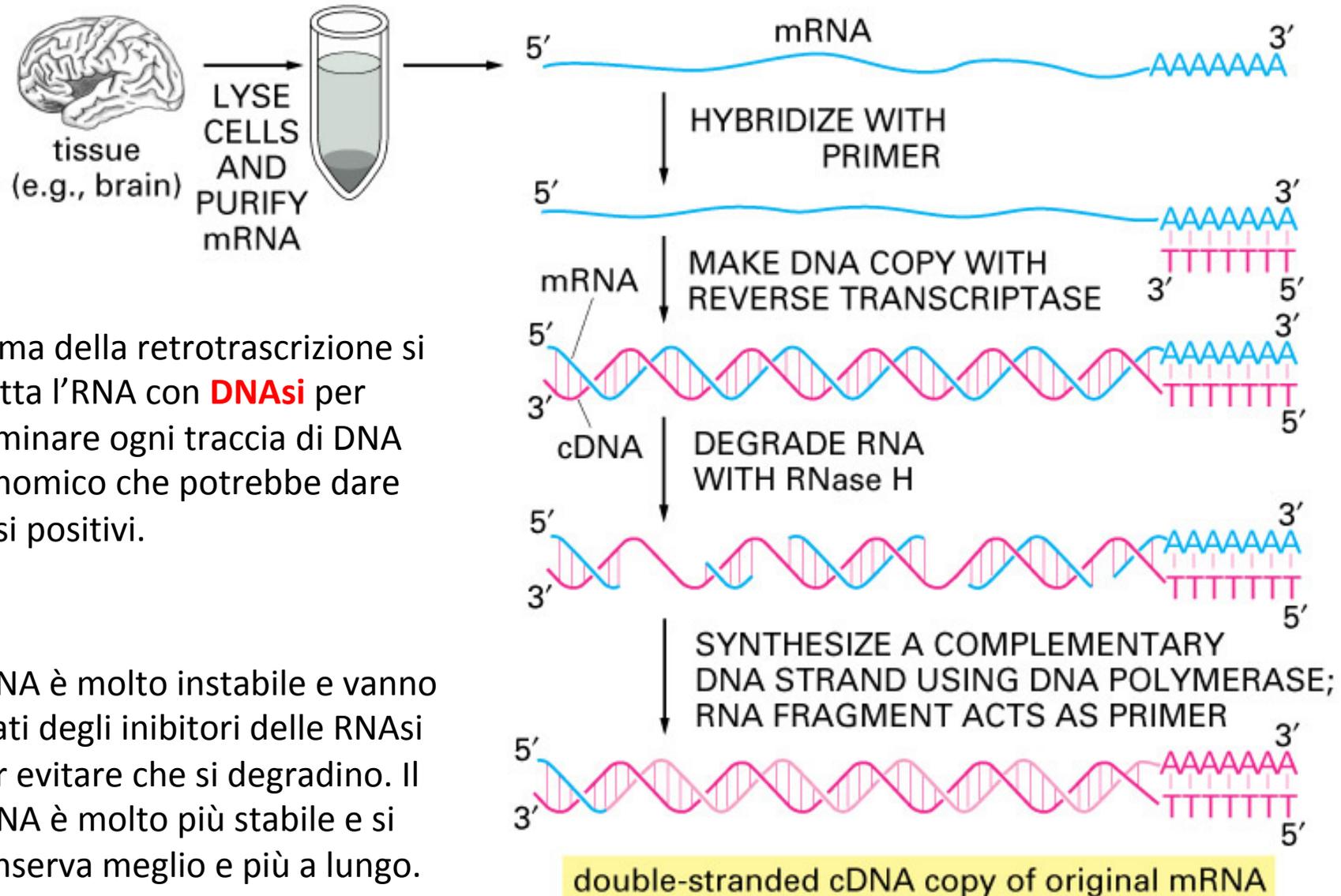
Uso di enzimi hot start

La PCR come strumento per l'analisi dell'espressione genica → RT-PCR

- la DNA polimerasi richiede un DNA come template e non è in grado di copiare l'RNA.
- L'RNA deve prima essere copiato a cDNA usando una trascrittasi inversa.
- Il cDNA può fungere da stampo per la PCR – non necessità di essere a doppio filamento.

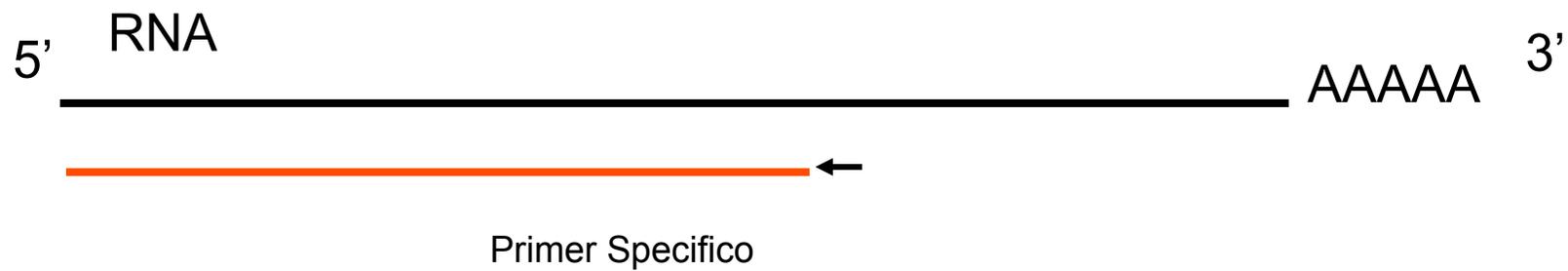


RT-PCR



Prima della retrotrascrizione si tratta l'RNA con **DNAsi** per eliminare ogni traccia di DNA genomico che potrebbe dare falsi positivi.

l'RNA è molto instabile e vanno usati degli inibitori delle RNAsi per evitare che si degradino. Il cDNA è molto più stabile e si conserva meglio e più a lungo.

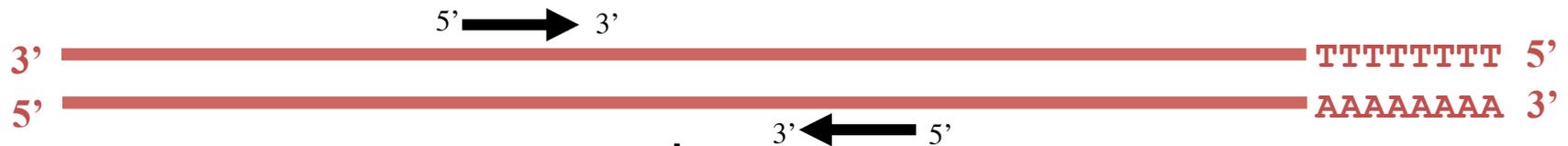


PCR utilizzata per rivelare uno specifico mRNA:
PCR in seguito a trascrittasi inversa (RT-PCR)

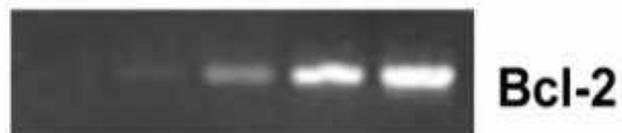
cDNA



- Amplificazione della sequenza di interesse con oligonucleotidi di innescio specifici:

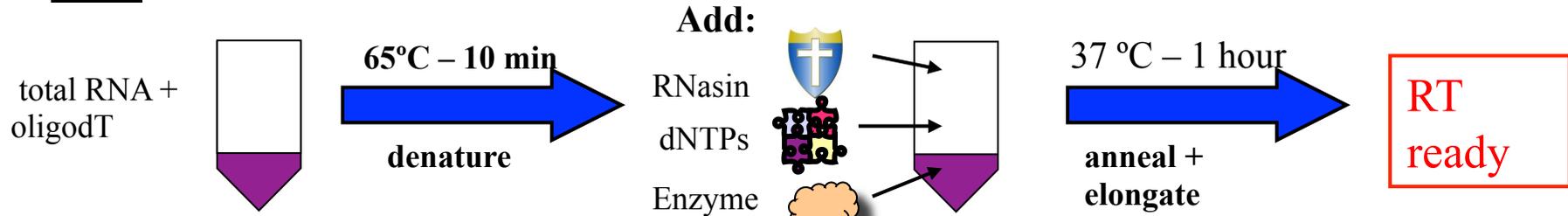


- Analisi dei prodotti dell'amplificazione (elettroforesi)

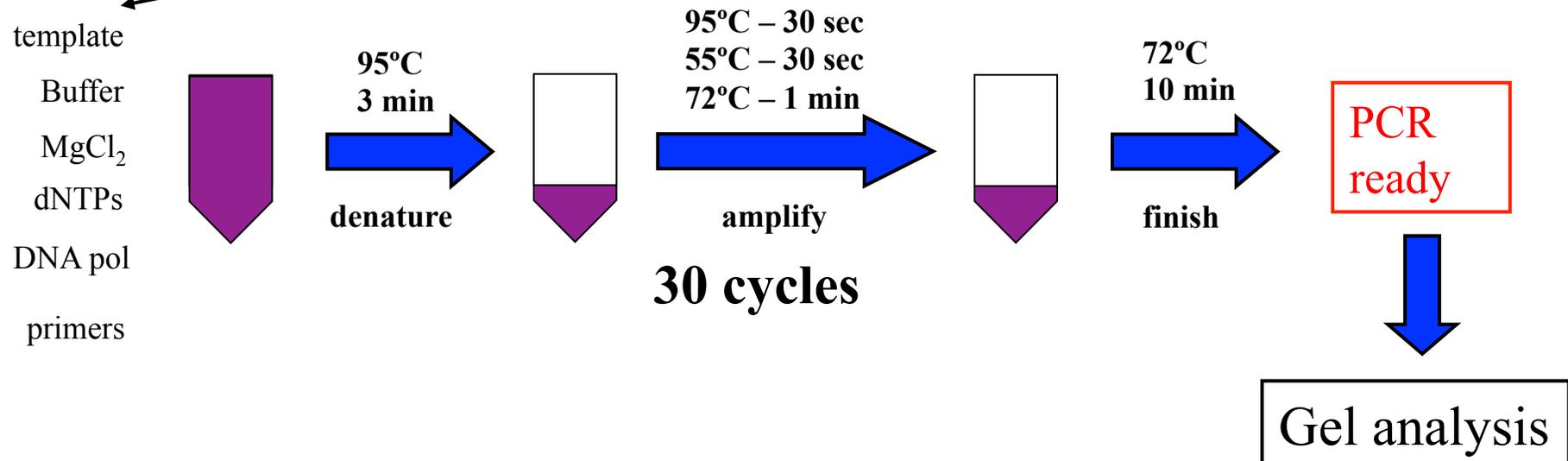


RT-PCR

RT:



PCR:

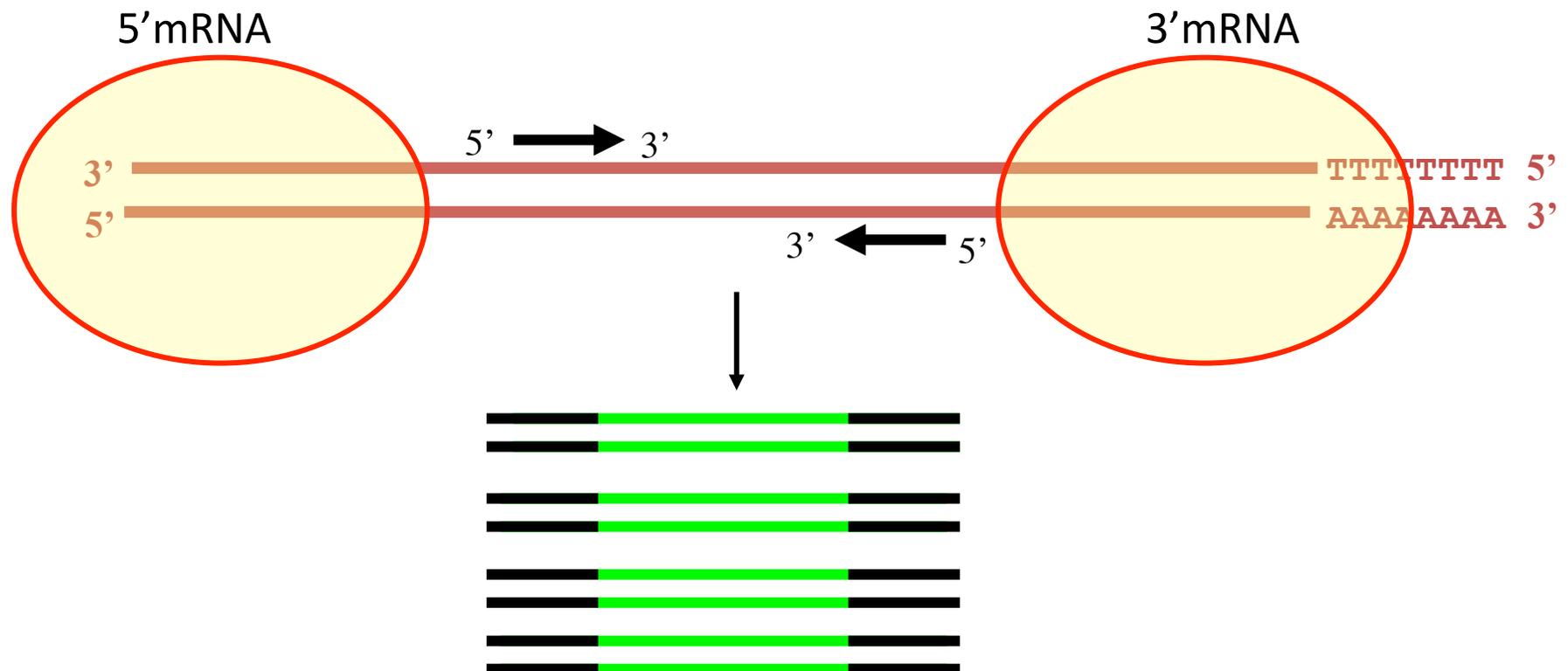


Preparazione ed uso dei campioni

- ▶ È importante avere familiarità con i principi generali per lavorare con l'RNA:
 - ▶ Evitare le RNAsi
 - ▶ Indossare sempre i guanti quando si manipolano reagenti o supporti che verranno utilizzati per l'estrazione di RNA e per la trascrizione inversa
 - ▶ L'acqua RNAsi free può essere acquistata commercialmente oppure acqua milliq può essere trattata con dietil pirocarbonato (DEPC)

RACE PCR

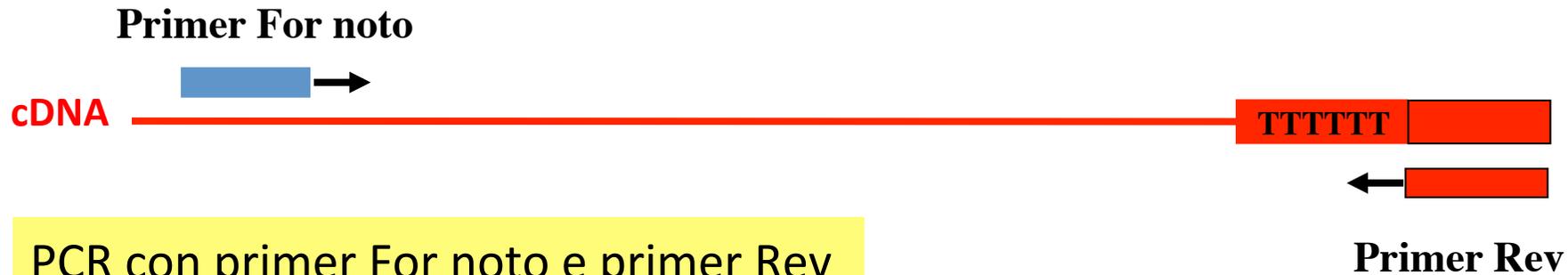
RACE: Rapid amplification of (5' or 3') cDNA ends: è una tecnica di amplificazione che usando come stampo mRNA retrotrascritto in cDNA permette di recuperare le estremità 3' o 5' della molecola di messaggero → **bisogna sempre che ci sia qualcosa di noto.**



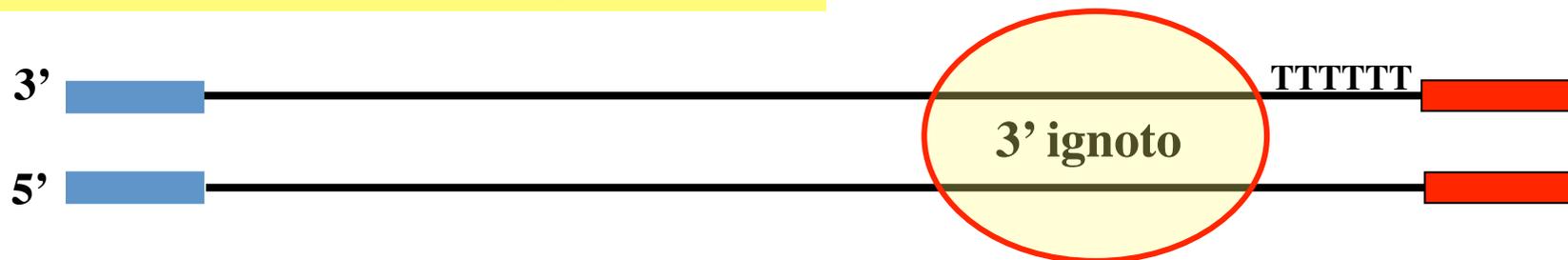
RACE ricerca del 3' ignoto



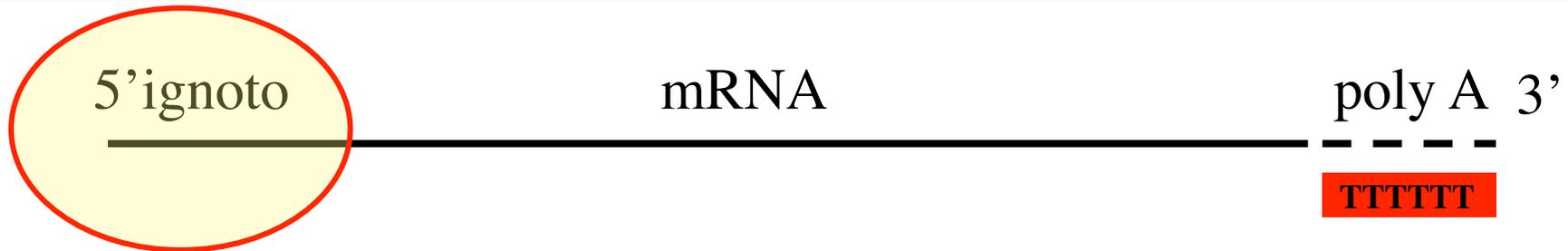
sintesi del I filamento di cDNA con RT con primer oligo dT aganciato ad una coda a sequenza nota



PCR con primer For noto e primer Rev complementare alla coda aggiunta



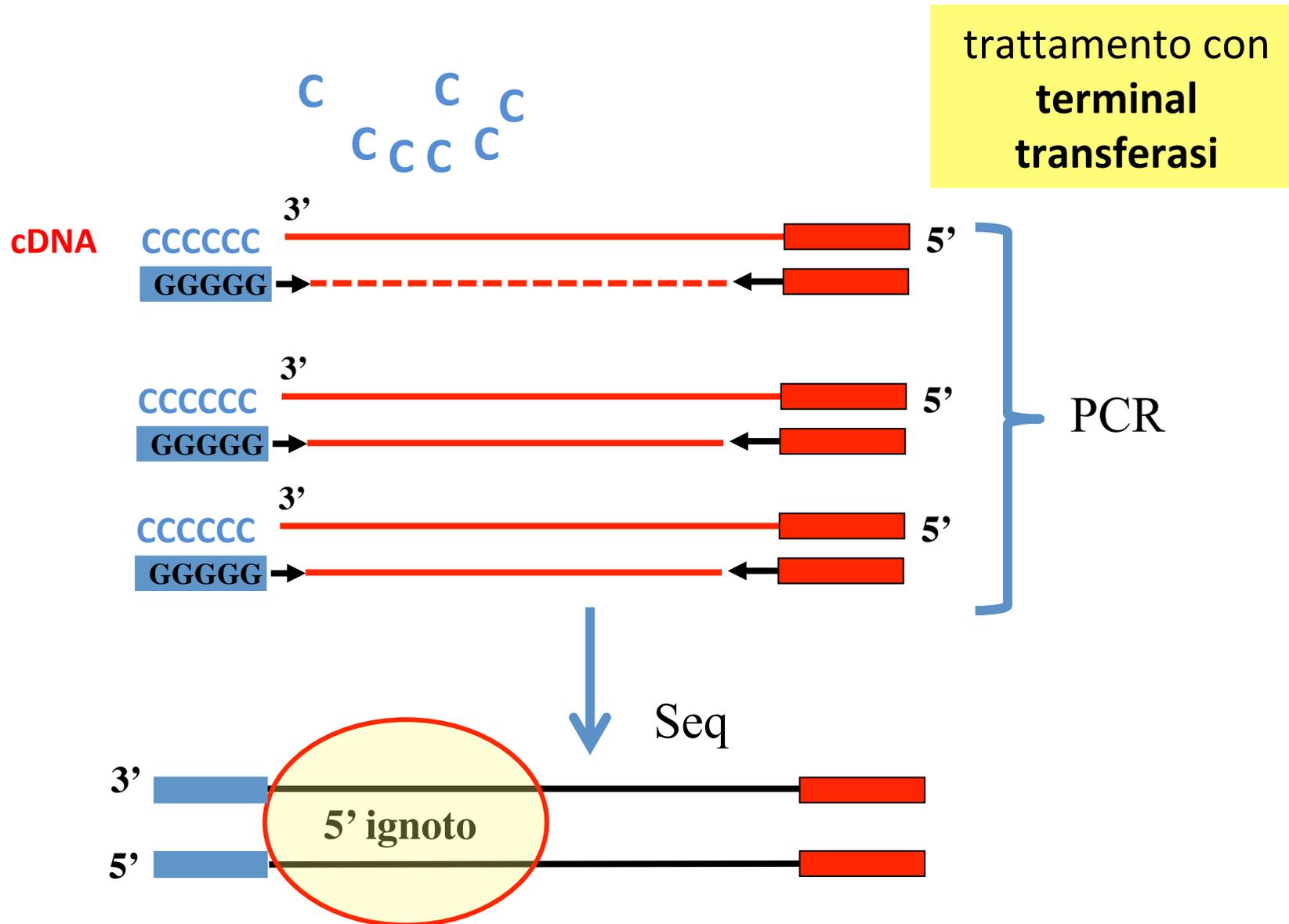
RACE ricerca del 5' ignoto



sintesi del I filamento di cDNA con RT con primer oligo dT, ma è preferibile utilizzare un primer interno o random esameri in quanto le molecole di mRNA sono lunghe anche diverse Kb

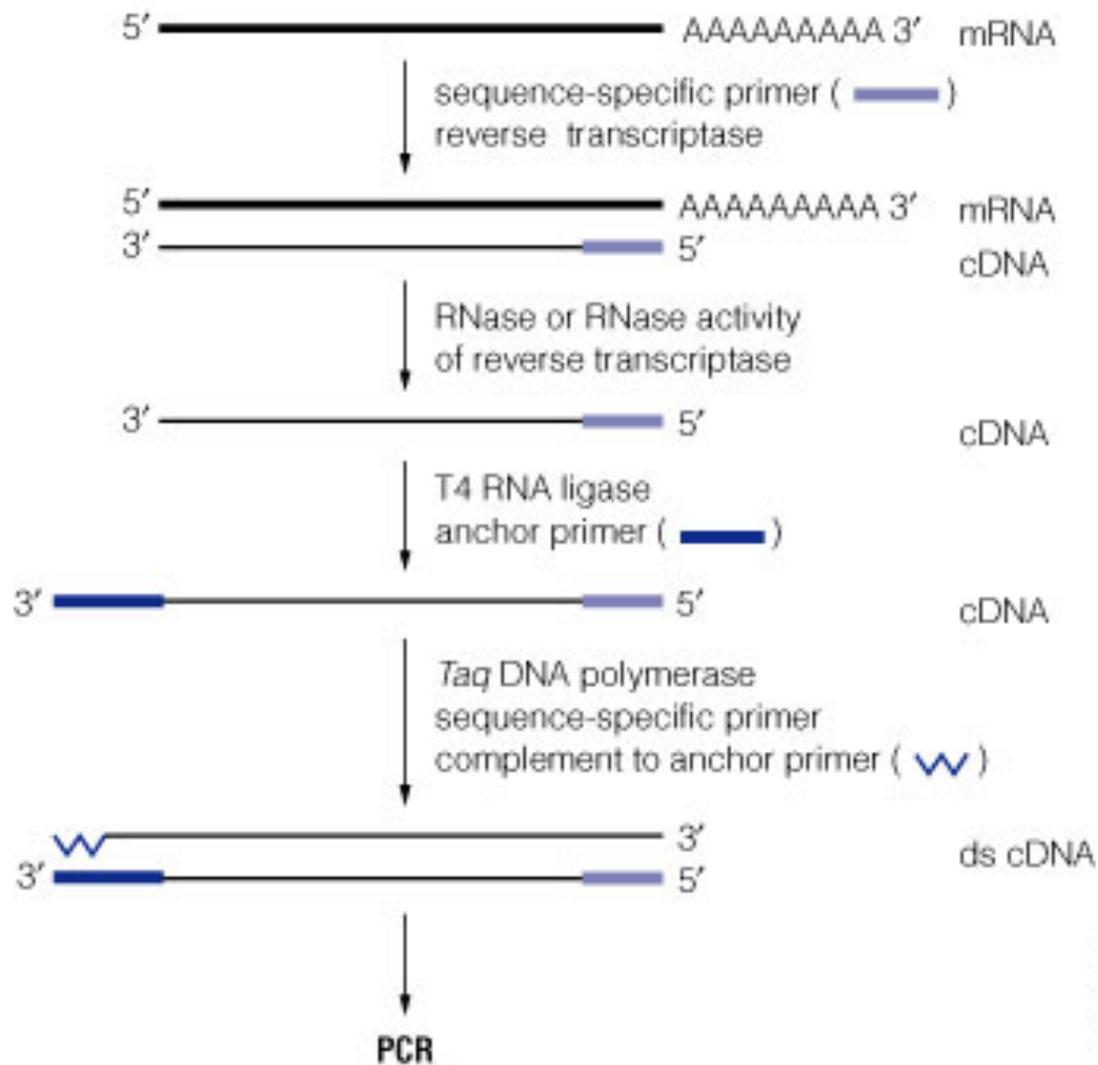


RACE ricerca del 5' ignoto



RACE PCR

Rapid amplification of 5' → anchor primer



RACE 5'CAP-FINDER

Metodo per riuscire a selezionare solo le molecole di mRNA che possiedono un'estremità 5' completa.

1: enzima CIP (calf internal phosphatase, fosfatasi alcalina di vitello): **defosforilazione** delle molecole parziali di RNA

2: enzima TAP (tobacco acid pyrophosphatase): **apre il capping al 5'** delle molecole intatte.

Tali molecole saranno quindi le uniche fosforilate in grado di legare un oligonucleotide ad opera di una ligasi.

PCR sarà in grado di utilizzare come stampo soltanto le molecole con estremità 5' completa.

